

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL Y SU POTENCIAL DE
DIFERENCIACIÓN NEUROGÉNICO

Por

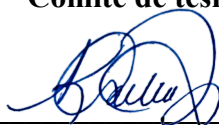
ADA PRICILA LÓPEZ LOZANO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

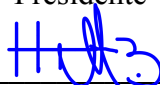
2021

CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL Y SU POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN NEUROGÉNICO

Comité de tesis



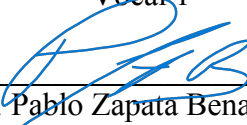
Dra. Katiushka Arévalo Niño
Presidente



Dra. Brenda González Hernández
Secretario



Dra. Diana Reséndez Pérez
Vocal 1



Dr. Pablo Zapata Benavidez
Vocal 2



Dra. Vianey González Villasana
Vocal 3



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirector de Posgrado

SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

**CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL Y SU POTENCIAL
DE DIFERENCIACIÓN NEUROGÉNICO**

Dirección de tesis



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Presidente



Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos
Director Externo

AVISO DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Antes de comenzar el camino del Doctorado, sentía mucha ilusión por la oportunidad de emprender un reto más de superación y aprender cosas completamente nuevas para mí. Estos sentimientos iban acompañados de incertidumbre, dudas y muchos nervios, nunca olvidaré a las personas que a lo largo de esos cuatro años estuvieron presentes, interactuando de distintas maneras para que esto comenzara, también, a quienes en el trayecto del camino brindaron su campaña, palabras de animo y apoyo para animarme a continuar.

Primeramente quiero agradecer, y estaré siempre agradecida con Dios Padre, por todas las bendiciones que ha puesto en mi vida por todas las bendiciones que ha puesto en mi vida, una de ellas y la más importante, es que me permite contar con una familia amorosa, en quienes siempre he encontrado apoyo. Dios nunca siempre esta presente, y en particular durante el tiempo del Doctorado en los momentos más difíciles, comprobé su gran amor, mostrándome la solución y claridad cuando más lo necesité.

Agradecida con la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) Institución formadora de mí Educación Profesional, así también con la Facultad de Ciencias Biológicas de a UANL y la Subdirección de Posgrado en Biotecnología por su apertura y apoyo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el constante apoyo en el desarrollo científico y la aportación de la beca de Doctorado.

A las Doctoras, Katiushka Arévalo Niño y Myriam Angélica de la Garza Ramos, por fungir como excelentes asesoras mi agradecimiento por su accesibilidad en la dirección y aceptación del proyecto siempre agradecida por su apoyo, orientación y colaboración en el financiamiento del mismo. A la Dra. Yolanda Gutiérrez Puente, agradecida también con usted Doctora por estar al pendiente durante todo este tiempo, gracias por toda su orientación y tiempo. A ustedes tres Doctoras, todo mi respeto y admiración, le doy gracias a Dios por haberlas puesto en mi camino.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la UANL y al Dr. Carlos Eduardo Medina de la Garza, por su accesibilidad al permitir durante su gestión, que el proyecto se desarrollara en este recinto.

A mi madre Patricia Lozano Zambrano, por su amor, sus consejos siempre acertados, estando atenta cada día y en cada dificultad, no hubo un solo momento en el que no haya recibido su apoyo, sin dejar de creer en mí y teniendo fe, cuando yo sentía perderla, por enseñarme que en las pruebas es cuando menos debemos bajar la guardia, por ser un gran ejemplo y motivación siempre. Te amo mamá, sin ti no hubiera podido concluir este proyecto.

A mis Hermanos Héctor, Hernán, Sara y Manuel, por ser ejemplo de perseverancia y valentía, gracias por sus palabras cada uno con su manera distinta de ser dándome su apoyo, consejo y animo.

A mis tíos Rosa Amelia, Claudia y Esaú que son como unos segundos padres para mí, gracias por estar presentes, con su amor y gran corazón, demostrándome que siempre puedo contar con ustedes.

DEDICATORIAS

“Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del Cielo tiene su hora.”

Eclesiastes 3:1

Brindo este y todos mis logros a Dios por su infinita misericordia, porque nada sería posible sin Su gran amor.

Dedicatoria a Patricia Lozano Zambrano por motivarme y alentarme cada día para concluir este proyecto.

A mi abuela Amelia Zambrano de Lozano, que sé, que desde el cielo siempre esta presente y pendiente de cada momento especial en mi vida.

A mi bebita Pricila Aurora López Rodríguez, eres mi inspiración, el regalo mas bello que Dios me a dado, siempre daré mi mayor esfuerzo por ser mejor para ti y darte lo mejor.

A mi esposo Arturo Emmanuel Rodríguez Leyva, gracias amor tu apoyo incondicional siempre, eres mi mejor amigo y acompañero.

Los amo mucho.

INDICE

Sección	Página
AVISO DE DERECHOS DE AUTOR.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
DEDICATORIAS	VII
INDICE.....	VIII
INDICE DE TABLAS.....	XI
INDICE DE FIGURAS.....	XII
INDICE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT	XVI
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.-ANTECEDENTES.....	2
2.1 Células Madre Hematopoyéticas.....	2
2.2 Células Madre Mesénquimales.....	5
2.3 Células Madre de Pulpa Dental.....	8
2.4 Diferenciación a Linajes Neuronales a partir de células SHED.....	11
2.5 Células Mesénquimales de Pulpa Dental de Dientes Deciduos y Permanentes empleados para terapia en alteraciones del Sistema Nervioso.....	13
3.-JUSTIFICACIÓN	14
4.-HIPÓTESIS.....	15
5.-OBJETIVOS	16
5.1.-Objetivo General.	16
5.2.-Objetivos Específicos.....	16
6.-MATERIAL Y MÉTODOS... ..	17
6.0.-Diagrama de estrategia experimental.....	17
6.1.-Obtención del tejido pulpar	17
6.1.1.- Criterios de Selección.....	17
6.1.2.- Extracción de Órganos Dentales.....	18

6.1.3.- Extracción de Pulpa Dental.....	18
6.2.- Disgregación Tisular	20
6.2.1.- Disgregación Mecánica.	20
6.2.2.- Disgregación Enzimática.....	21
6.3.- Conteo Celular en Cámara de Neubauer.....	22
6.4.-Cultivo Celular.....	22
6.4.1.-Medio de Crecimiento.....	22
6.4.2.-Tripsinización Celular.....	23
6.4.3.-Expansión Celular.....	23
6.5.-Separación Celular con Microperlas magnéticas conjugadas con Anticuerpo SSEA-4.....	24
6.6.-Citometría de Flujo.....	25
6.7.-Inmunocitoquímica Directa.....	26
6.8.-Cultivo de Diferenciación Neuronal.....	28
6.8.1.-Medio Neuronal A.....	28
6.8.2.-Medio Neuronal B.....	28
6.9.-Inmunohistoquímica Indirecta.....	29
7.-RESULTADOS.....	31
7.1.-Obtención de Muestras Biológicas a partir de Órganos Dentarios.....	31
7.2.-Cultivo Celular Primario.....	32
7.2.1.-Conteo en Cámara de Neubauer.....	32
7.2.2.-Ritmo de división de la Población Celular.....	32
7.2.3.-Análisis Morfológico.....	32
7.3.-Células Mesénquimales de Pulpa Dental Humana de Dientes Deciduos positivas a separación magnética con Anticuerpo SSEA-4.....	34
7.4.-Análisis de resultados en Citometría de Flujo.....	35
7.5.-Inmunohistoquímica Directa.....	36
7.6.-Cultivo de Neuroesferas Pre-inducción.....	37
7.7.-Cultivo de Diferenciación Neuronal.....	38
7.8.-Inmunocitoquímica Indirecta..	39
8.-DISCUSIÓN.....	40

9.-CONCLUSIONES..	44
10.-PERSPECTIVA..	46
11.-BIBLIOGRAFÍA.....	47

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I.-Características de Células Madre Hematopoyéticas y Mesénquimales.....	6
II.-Potencial de Diferenciación en Células Madre.....	6
III.-Características particulares de CM presentes en Pulpa Dental de Dientes Deciduos....	10
IV.-Fuentes de Obtención de CMM en cavidad bucal.....	11
V.-Anticuerpos monoclonales empleados para identificación de marcadores de membrana presentes en Células Mesénquimales.....	27
VI.-Titulación de anticuerpos empleados para Inmunohistoquímica indirecta.....	29
VII.-Características de las muestras obtenidas para el estudio.....	31
VIII.-Pase celular en relación con porcentaje de expansión.....	33
IX.-Inmunofenotipo Células SHED.....	35

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.-Protocolo para toma de muestras dentales.....	18
2.-Obtención de tejido pulpar humano a partir de dientes deciduos.....	19
3.-Proceso de disgregación tisular con disociador mecánico gentleMACS....	20
4.-Disgregación enzimática por medio de Dispasa y Colagenasa.....	21
5.-Cuantificación celular en cámara de Neumabuer.....	22
6.-Expansión de cultivo primario de SHEDS.....	24
7.-Separación con microperlas magnética conjugadas con anticuerpo SSEA-4.....	25
8.-Identificación de células Mesénquimales por Citometría de Flujo.....	26
9.-Portaobjetos con cámara de 16 pocillos para cultivo de células.....	27
10.-Portaobjetos con cámara de 2 pocillos para cultivo de células.....	29
11.-Microfotografías obtenidas con Microscopio de Contraste en distintas densidades de confluencia....	33
12.-Cultivo de células SHED positivas al anticuerpo SSEA-4.....	34
13.-Dot Plots obtenidos con Citometría de Flujo.....	35
14.-Inmunocitoquímica para identificación de Marcadores de membrana presentes en células Mesénquimales.....	36
15.-Desarrollo de Neuroesferas.....	37
16.-Diferenciación Neuronal.	38
17.-Inmunocitoquímica para identificación de marcadores de membrana presentes en células Neuronales.....	39

ASA	Clasificación de Asociación Americana de Anestesiología
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CCP	Cultivo Celular Primario
CD	Cúmulos de Diferenciación
CFU	Unidad Formadora de Colonias
CM	Célula Madre
CMA	Célula Madre Adulta
CME	Célula Madre Embrionaria
CMH	Célula Madre Hematopoyética
CMM	Célula Madre Mesénquimal
CO ₂	Monóxido de Carbono
CPL	Célula Primitiva Linfoide
DAPI	46-diamino-2-fenilindol
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPSC	Células Madre de Pulpa Dental Humana Dental Pulp Stem Cells
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
F	Fibroblasto
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GFAP	Proteína Fibrilar Acídica de la Glia
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
Mcr	Medio de Crecimiento
MNA	Medio Neuronal A
MNB	Medio Neuronal B
MO	Médula Ósea
mL	Mililitro

mM	Minimolar
μg	Microgramo
μM	Micromolar
MQ	Agua Bidestilada Milli Q
NGF	Factor de Crecimiento Neuronal
NIH	National Institute of Health
NT	Neurotrofina
PDH	Pulpa Dental Humana
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehido
PO	Pase Cero
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Rpm	Revoluciones por Minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
SFC	SFC
SHED	Células de Pulpa Dental de Dientes Deciduos
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nerviosos Periférico
SSEA-4	Marcador de Células Madre Embrionarias

RESÚMEN

Los trastornos neurológicos son patologías localizadas en estructuras del Sistema Nervioso (SN) como Cerebro, Médula Espinal y Nervios Periféricos. Entre los más comunes se encuentran, Demencia, Epilepsia, Accidente Cerebro Vascular, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Esclerosis Múltiple y en particular dentro del campo odontológico la Neuralgia del nervio trigémino, condición en la cual, el problema afecta también el aspecto social ya que los pacientes tienden a sufrir insomnio, depresión o se sienten orillados al suicidio hasta en un 25% de los casos. Las Células Madre de origen Mesénquimal (CMM) se han identificado como una fuente en el establecimiento de terapias celulares dirigidas para reparación de tejidos que han manifestado trastornos neurológicos y lesiones de nervios periféricos. Estas células de origen mesénquimal han sido identificadas en tejidos de origen dental. El propósito de nuestra investigación fue realizar el análisis de la capacidad de morfodiferenciación e histodiferenciación a Linaje Neural de Células Mesénquimales de Dientes Deciduos (SHED). A partir de células SHED en cultivo, se obtuvo una población positiva a el anticuerpo SSEA-4 por medio de separación magnetica, la cual fue caracterizada por inmunohistoquímica y citometría de flujo. Posteriormente se realizó ensayo de neuroesferas en medio suplementado con Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) y Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), para después inducir a neurodiferenciación con medio Neurobasal (Gibco). Finalmente se realizó ensayo de inmunohistoquímica indirecta para la identificación de marcadores neuronales. Posteriormente de la inducción con los factores de crecimiento epidérmico y fibroblástico, así como en medio de cultivo Neurobasal, cambios morfológicos e histológicos en las SHED positivas al anticuerpo SSEA-4, fueron observados. Al finalizar la inducción se identificó positividad de los marcadores Nestina, Tuji-1 y GFAP. Los hallazgos obtenidos en esta investigación demuestran que las SHED positivas a SSEA-4, presentaron positividad a los marcadores neuronales identificados en procesos de neurogénesis y crecimiento axonal. Esto indica que la pulpa dental de dientes deciduos es una fuente prometedora para terapias de regeneración relacionadas con enfermedades neurodegenerativas y alteraciones de nervios periféricos.

ABSTRACT

Neurological disorders are pathologies located in structures of the Nervous System (NS) such as the Brain, Spinal Cord and Peripheral Nerves. Among the most common are Dementia, Epilepsy, Stroke, Alzheimer's disease, Parkinson's, Multiple Sclerosis and in particular within the dental field Trigeminal Nerve Neuralgia, a condition in which the problem also affects the social aspect since patients will suffer insomnia, depression or feel on the edge of suicide in up to 25% of the cases. Stem Cells of Mesenchymal origin (MSC) have been identified as a source in the establishment of targeted cellular therapies for tissue repair that have manifested neurological disorders and peripheral nerve injuries. These cells of mesenchymal origin have been identified in tissues of dental origin. The purpose of our research was to perform the analysis of the morphodifferentiation and histodifferentiation capacity to Neural Lineage of Mesenchymal Cells of Deciduous Teeth (SHED). From SHED cells in culture, a positive population for the SSEA-4 antibody was obtained by means of magnetic separation, which was characterized by immunohistochemistry and flow cytometry. Subsequently, a neurosphere assay was performed in medium supplemented with Fibroblast Growth Factor (FGF) and Epidermal Growth Factor (EGF), to later induce neurodifferentiation with Neurobasal medium (Gibco). Finally, an indirect immunohistochemical assay was carried out for the identification of neuronal markers. After induction with epidermal and fibroblastic growth factors, as well as in Neurobasal culture medium, morphological and histological changes in SHEDs positive for SSEA-4 antibody were observed. At the end of the induction, positivity of the Nestina, Tuji-1 and GFAP markers was identified. The findings obtained in this research show that SHED positive to SSEA-4, presented positivity to the neuronal markers identified in processes of neurogenesis and axonal growth. This indicates that the dental pulp of deciduous teeth is a promising source for regenerative therapies related to neurodegenerative diseases and peripheral nerve disorders.

1.-INTRODUCCIÓN

Enfermedades degenerativas, eventos traumáticos y heridas que pueden presentarse durante o posteriormente a procedimientos médicos, generan alteraciones neuronales, inflamación, muerte celular y malformación de la cito-arquitectura en los Sistemas Nervioso Central (SNC) y Periférico (SNP) (Dugger y Dickson, 2017).

Terapias medicas convencionales, presentan una eficacia limitada en la recuperación funcional del daño neuronal. Con la maduración del Sistema Nervioso (SN), se ha comprobado que la capacidad de generar nuevas neuronas y células gliales se va reduciendo. (Dugger y Dickson, 2017).

Tratamientos celulares basados en Células Madre (CM), prometen promover la regeneración neuronal, ya que ha sido comprobado que presentan múltiples factores neurotróficos y antiinflamatorios que favorecen la reparación nerviosa, estableciéndose como una fuente prometedora para terapia celular en el manejo de perturbaciones del SNC y SNP. Estas células pueden ser ubicadas principalmente en medula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical y tejido dental (Ciaramitorio et al., 2010).

En tejido dental, las CMM, pueden ser obtenidas de pulpa de adultos y niños, manifestando las características de autorenovación y diferenciación multilínea, usualmente son consideradas como desechos biológicos, por ello no representan consideraciones éticas para su manejo en investigación, son de fácil obtención y sin necesidad de procedimientos invasivos (Miura, Gronthos, Zhao *et al.*, 2003).

El desarrollo embrionario de los órganos dentarios se encuentra íntimamente relacionado con el del SN, debido a que ambos tejidos provienen de células neuroepiteliales ubicadas en las crestas neurales que dan lugar a la formación del tubo neural, debido a esto, el estudio de células mesenquimales obtenidas de pulpa dental humana, se encuentra en evolución, con el fin de desarrollar terapias celulares, dirigidas en la reparación del SN (Gronthos *et al.*, 2000).

2.-ANTECEDENTES

2.1 Células Madre Hematopoyéticas

La investigación y desarrollo sobre el campo de las células madre (CM) se encuentra constantemente avanzando y aportando nuevo conocimiento sobre como el organismo humano puede ser desarrollado a partir de la extraordinaria combinación de dos células y como puede remplazar células de tejidos dañados con el proceso de reparación celular. Teniendo como premisa estos fenómenos naturales, esta prometedora área de la ciencia apunta hacia la posibilidad de crear terapias celulares enfocadas en la medicina regenerativa.

En base a estudios histológicos en 1909, Maximow argumentó que los diferentes linajes celulares de la sangre provenían de una fuente en común descrita como célula primitiva linfoide (CPL), lo cual implicaba que una sola célula morfológicamente primitiva era capaz de diferenciarse en las distintas poblaciones celulares sanguíneas (Maximow, 1909).

En 1916 Vera Danchakoff afirmó que los eritrocitos, linfocitos, leucocitos, células del tejido conectivo, así como mastocitos y células plasmáticas, todas ellas unidades celulares morfológicamente y fisiológicamente diferentes, durante su estadio embrionario presentaban una CM en común, la cual se conservaba en la etapa adulta y se convertiría en una fuente regenerativa y de diferenciación (Danchakoff, 1916; Kracke, 1914).

Posteriormente, en 1936 estudios en médula ósea (MO) y células de sangre periférica de conejos desde etapas tardías fetales hasta los 6 meses de desarrollo, brindaron una amplitud al campo de estudio en CM, se confirmó que la función de la MO no solo estaba ligada al desarrollo de tejido óseo, si no que a la vez fungía como un órgano hematopoyético formando durante el desarrollo tres poblaciones, células sanguíneas, granulocitos y megacariocitos. Con este estudio se afirmó que a los 6 meses de edad se alcanzaban los mismos niveles celulares en sangre periférica que están presentes en un conejo durante el periodo fetal (Sabin *et al.*, 1936).

La célula progenitora o CM de los diversos linajes de células sanguíneas se le comparó con la célula que años atrás Maximow definió como célula primitiva linfoide (CPL), posteriormente, en diversas muestras de sangre periférica, fueron identificadas las mismas células progenitoras presentes en muestra de sangre proveniente de MO (Sabin *et al.*, 1936).

Evidencia de la presencia de CM en sangre periférica fue confirmada en 1962 al realizarse un trasplante celular en ratas radiadas letalmente, se observó la supervivencia de los mamíferos y su rápida estabilidad al presentar, un conteo normal de sangre periférica posterior al trasplante (Goodman and Hodgson, 1962). Estas células madre hematopoyéticas (CMH) de MO presentaron 2 funciones principales, diferenciarse a elementos hemáticos además de mantener y renovar la población de CM (Lewis and Trobaugh, 1964).

En 1967 mediante células contenidas en el bazo de ratones fue expuesto que no solo producían elementos eritroides, mieloides y megacariocitos, sino también precursores de linfocitos inmunocompetentes funcionalmente, con esta premisa Wu *et al.*, con un método de trasplante de MO en ratones radiados lograron restablecer las CMH y con ellas fueron capaces de repoblar el timo, los nódulos linfáticos, bazo y MO, con esto se demostró que estas estructuras presentaban un precursor celular en común, así como los mismos marcadores cromosómicos (Trentin *et al.*, 1967; Wu *et al.*, 1968).

La experimentación y buenos resultados con los trasplantes de MO en animales alentaron el área de la medicina clínica para aplicación en enfermedades humanas. Posterior a la realización de un trasplante de MO en paciente con el síndrome de Wiskott Aldrich, previo a inmunosupresión y siendo el donante un hermano del paciente, al paso de 24 meses después a la intervención, se demostró una exitosa recuperación clínica (Bach *et al.*, 1968).

De los primeros injertos de MO realizados, la mayoría resultaron fallidos debido a la falta de conocimientos sobre la tipificación de los tejidos, la inmunosupresión y la experiencia

en el cuidado de apoyo a los pacientes con aplasia medular. El interés y la perseverancia en la premisa de establecer una terapia en base al trasplante de MO en humanos con aplasia medular, llevaron consigo nuevos conocimientos que ayudaron a ir cimentando por medio de la experimentación, perspectivas positivas (Bortin, 1970).

En la década de los 70^s, con el descubrimiento del sistema HLA (Human Leukocyte Antigen), antígenos formados por moléculas que se encuentran en la superficie de casi todas las células de los tejidos del individuo y también en los glóbulos blancos de la sangre. El sistema HLA fue dado a conocer como un sistema que cumple con la función de diferenciar lo propio de lo ajeno y es el responsable de la respuesta inmune, se permitió a la medicina dar un salto cualitativo en las posibilidades de éxito de un trasplante, además fue posible comprender mejor el fenómeno del rechazo y enfermedad del injerto (Bach, 1970).

En 1971 fue realizado un trasplante de MO en cinco pacientes con Leucemia Mielocítica Aguda y en un paciente con Leucemia Monocítica Aguda, usando como donantes a hermanos con antígenos leucocitarios compatibles, los pacientes fallecieron tras el trasplante, pero los resultados de autopsia demostraron que en ningún paciente había evidencia de Leucemia (Santos *et al.*, 1971).

Estudios realizados en muestras celulares de cordón umbilical humano, manifestaron las mismas CMH que se encontraban en la médula ósea, con capacidades también de autorrenovación y diferenciación a otros linajes celulares, presentando mayor producción de colonias secundarias (Nakahata and Ogawa, 1982).

En 1987 las CM de la MO fueron identificadas como células multipotentes al ser precursoras de diversos tipos de células sanguíneas (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, eritrocitos, megacariocitos, linfocitos B y linfocitos T) y manifestar una alta capacidad de renovación durante el trasplante de médula (Dexter, 1987).

2.2 Células Madre Mesenquimales

Estudios *in vitro* de suspensiones de MO mostraron la formación de colonias de células fibroblásticas, las cuales presentaban un predecesor común. A cada colonia de células se le denominó unidad formadora de colonias de fibroblastos (CFU-F). Con estos descubrimientos se llegó a la conclusión que los 2 sistemas asociados a médula ósea y diferenciación ósea son los sistemas hematopoyético y estromal. De este último (sistema estromal) se afirmó que sus CM son capaces de generar diversos linajes de células los que incluyen componentes osteogénicos, adipogénicos y líneas de células fibroblásticas (Owen *et al.*, 1987).

Owen y Friedenstein propusieron la existencia de una célula troncal o madre presente en el tejido conectivo (TC) asociado a la MO, la cual era capaz de dar origen a diferentes tipos celulares entre los que se incluían tejido muscular, adiposo, cartílago y hueso, estas células formadoras fueron denominadas Células Madre Mesenquimales (CMM) (Owen and Friedenstein, 1988). Al evidenciarse que la MO humana contenía CMM que fabricaban la red de TC llamado Estroma, estudios fueron realizados para identificar CMM de MO, derivadas de donantes humanos. Fueron aisladas, expandidas en cultivo y posteriormente inducidas a diferenciación ósea (Haynesworth *et al.*, 1992).

Las células CMM morfológicamente mostraron en cultivo adquirir una forma de tipo espigada, asimilando un huso, con un núcleo central y alargado (Pittenger *et al.*, 1999). A diferencia de las CMH, las CMM de MO fueron nombradas como células adherentes al formar una monocapa celular adherida al frasco de cultivo, además, mostrar su organización en CFU-F o clusters. Su carácter multipotencial de diferenciación pronto despertó gran interés apuntando como alternativa en las terapias celular y génica.

Con la intención de discriminar los Cúmulos de Diferenciación (CD) o marcadores de membrana entre CMH y CMM (Tabla 1), cultivos de muestras de MO extraída de la cresta iliaca de 20 donantes, fueron puestos en observación, de los que se determinó, la

negatividad de las CMM a los epítopes presentes en las CMH (Tabla I), (Colter *et al.*, 2000).

Tabla I
Caracterización de Células Madre Hematopoyéticas y Células Madre Mesénquimales

Cúmulos de Diferenciación presentes en Células Madre Hematopoyéticas	(CD34, CD11B, CD14, CD31, CD43, CD45, CD56, CD68 y CD133) (Colter <i>et al.</i> , 2000)
Cúmulos de Diferenciación presentes en Células Madre Mesénquimales	CD44, CD146, CD106, CD129, CD166, CD73, CD90, CD105 (SH2, SH3 y SH4) y HLA-1 además del anticuerpo monoclonal STRO-1 (Bianco <i>et al.</i> , 2001)

*CD Cúmulos de Diferenciación, modificado de (Colter *et al.*, 2000), (Bianco *et al.*, 2001)

Con el posterior descubrimiento de las Células Madre Embrionarias (CME) (CMH y CMM) fue demostrada su alta tasa de proliferación al multiplicarse indefinidamente, pero con el manejo de este tipo de linaje celular, una gran desventaja en la experimentación, es la responsabilidad ética que implica su empleo.

Los distintos grados de potencialidad han sido evaluados, demostrando así la capacidad de las CM de diferenciarse en diversos tejidos del organismo humano (Tabla II).

Tabla II
Potencial de Diferenciación de Células Madre

Totipotente	Capacidad que tiene la célula de dirigir el desarrollo total de un organismo.
Pluripotente	Capacidad que tiene la célula de dar origen a precursores que derivan de cualquiera de las 3 hojas o capas germinativas: ectodermo, mesodermo y endodermo.
Multipotente	Capacidad que tiene la célula de dar origen a precursores relacionados solamente a una de las 3 hojas o capas germinativas.

Unipotente	Capacidad que tiene la célula de dar origen a precursores de una sola línea celular.
------------	--

*(Rojas *et al.*, 2012)

Estudios posteriores con CMM mostraron, que expresaban una gran variedad de proteínas en su superficie, las cuales incluyen integrinas, receptores de factores de crecimiento, receptores de citosinas así como moléculas de adhesión, además de producir moléculas de la matriz extracelular en la que se destacan fibronectina, colágeno tipo I, III, IV, laminina, hialuron y proteoglicanos. Información reciente muestra la importancia de discernir entre las fuentes de obtención de las CM como las CME totipotentes (obtenidas a partir de las primeras etapas de formación del embrión) y las células madre adultas (CMA) de las cuales sus fuentes han podido ser identificadas en tejidos como MO, sistema neuronal, sistema gastrointestinal, musculo esquelético, musculo cardiaco, hígado, páncreas, pulmón, tejido adiposo así como también diversos tejidos de cavidad bucal, presentes en su mayoría en las pulpas de los dientes deciduos y permanentes. Análisis con CMA han descrito su capacidad de diferenciarse funcionalmente a células especializadas procedentes de capas embrionarias distintas a las de su origen; así también su bien establecido carácter multipotencial al actuar como células pluripotentes (Jiang *et al.*, 2002; Herzog *et al.*, 2003).

Una de las habilidades biológicas que ha identificado en CMA, ha sido la capacidad de alterar drásticamente su fenotipo en respuesta a los cambios del microambiente donde se desarrollan, a esta manera de comportarse, se le ha nombrado “fenómeno de plasticidad” (Rutenberg *et al.*, 2004). Este fenómeno fue analizado por primera vez en estudios con progenitores derivados de la MO, donde pudieron ser observados cambios en el fenotipo de las células inmaduras bajo condiciones controladas que simulaban ambientes diferentes al medular. Con esta y más evidencias, obtenidas tanto *in vivo* como *in vitro*, se logró reconocer que las CMA, son capaces de producir células con una expresión fenotípica característica de otras células, cuando son transferidas a un microambiente diferente al original (Heike and Nakahata 2004).

2.3 Células Madre de Pulpa Dental

La capacidad biológica de formación y reparación del tejido dental humano ha marcado un punto de gran interés en la investigación. El comportamiento de las CMM, al ser progenitores de células presentes en tejidos dentales como pulpa, dentina y folículo dentario, fue comparado con Odontoblastos, células encargadas de la formación de Dentina, tejido duro, calcificado y altamente inorgánico del diente. Poblaciones celulares proliferativas aisladas de la Pulpa Dental Humana (PDH) de terceras molares de adultos de entre 19 y 29 años, y de MO, obtenidas de voluntarios de entre 20 y 35 años de edad, fueron trasplantadas en la superficie dorsal de ratones inmunocomprometidos. A las 6 semanas del trasplante, fue posible observar en la zona de injerto realizado con células provenientes de PDH, la formación de un tejido estructuralmente parecido a Dentina y la identificación de células Odontoblásticas, mientras que, en el injerto realizado con células de MO, se observó la formación de hueso lamelar, conteniendo Osteocitos en su porción interna y un margen superficial rodeado por Osteoblastos. Bajo este hallazgo se señaló, que ambos presentaban un perfil de expresión de proteínas parecido, además, ser clonogénicas y altamente proliferativas. Describiendo así, que la PDH al igual que la MO presentaba CM en su interior (Gronthos *et al.*, 2000).

Uno de los acontecimientos más importantes en el descubrimiento de las Células Madre de Pulpa Dental Humana-Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) fue realizado por el Dr. Songtao Shi, investigador del National Institute of Health (NIH) de los Estados Unidos en el año 2000 al extraer de un diente recién exfoliado de la boca de su hija de 6 años de edad, el tejido pulpar el cual analizó, y luego de la correspondiente verificación, fue revelado en el año 2003 por el NIH que en este tejido se encontraban células madre vivas. Shi y sus colaboradores nombraron a esta nueva fuente de células madre como SHED (Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth) (Miura, 2003).

Posteriormente, que encontró evidencia de que en PDH de dientes deciduos como de dientes permanentes, mostraron ser una fuente inesperada y única de CM. Esta nueva fuente de obtención abrió la puerta a una etapa más en este campo de la investigación

sobre CM de origen dental. Las SHED en cultivo presentaron, la morfología típica fibroblastoide de las CMM, así, como la expresión de múltiples antígenos característicos de estas, como, STRO-1, CD146, CD90, CD106, y CD166 además de CD129 y CD105 (Gronthos *et al.*, 2002).

El potencial de las SHED en diferenciación para Terapia Celular (TCe) fue probado *in vivo* e *in vitro* con muestras de PDH provenientes de dientes incisivos deciduos de niños de entre 7 y 8 años. El tejido fue sometido a diferenciación a tejido mineralizante (Osteoblastos y Odontoblastos), a tejido neuronal y finalmente tejido adiposo. En la diferenciación a tejido mineralizado fue establecido un medio de cultivo en base a L-ascorbato-2-fosfato, dexametasona y fosfato inorgánico principalmente. La tinción con carmín de alizarina mostro positividad después de 4 semanas de inducción, indicando así acumulación de calcio en el tejido neoformado. El análisis por medio de Western Blot arrojó resultados positivos a los marcadores óseos CBFA1, ALP, MEPE, Sialoproteína ósea y DSPP. El RT-PCR mostro resultados confirmatorios para los marcadores odontoblásticos, CBFA1, Osterix y Osteocalcina. Consecutivamente, por medio de un análisis inmunohistoquímico del tejido mineralizado, con el anticuerpo para DPSCs específico para tejido de dentina demostró su positividad, confirmando que las SHED son capaces de diferenciarse a odontoblastos y tejido mineralizado respectivamente (Miura *et al.*, 2003).

El desarrollo potencial neuronal fue estudiado *in vivo*, se inyectaron SHED en la circunvolución dentada del hipocampo de ratones inmunocomprometidos. Se realizó un examen histológico que evidencio la sobrevivencia celular por más de 10 días dentro del microambiente del cerebro del modelo animal y la continua expresión de marcadores neuronales. La inducción de SHED en cultivo adipogénico también arrojó resultados alentadores por medio de RT-PCR semicuantitativa, los resultados fueron positivos para el proliferador de Peroxisomas-y 2 y Lipoproteínlipasa, transcritos específicos de adipocitos. En base a esto se identificó que la PDH remanente derivada de dientes deciduos exfoliados contiene CM de tipo mesenquimal capaces de diferenciarse no solo a linajes provenientes de su misma capa embrionaria sino también a otras formas celulares

provenientes de diferentes capas germinativas como es el caso de las células neuronales derivadas de ectodermo. Por lo cual han sido clasificadas como células pluripotentes (Miura *et al.*, 2003).

Las SHED han manifestado características distintas a DPSCs, entre las mas relevantes que han identificadas son su mayor ritmo de proliferación y alta capacidad de diferenciación, como se puede observar en la tabla III.

Tabla III
Características particulares de CM presentes en Pulpa Dental de Dientes Deciduos

Proceso de desarrollo de tejido distinto que a DPSCs
Mayor ritmo de proliferación
Alta capacidad de diferenciación
Tejido en un estado más inmaduro que el encontrado en DPSCs
Formación de grupos celulares con aspecto esférico
Función diferente

* (Miura *et al.*, 2003).

Los tejidos embrionarios que derivan a las SHED son el Ectodermo y Ectomesenquima (mesodermo que en las etapas prenatales de la formación contiene células de la cresta neural), por ello, se ha demostrado la viabilidad de diferenciar a tejido neuronal a partir de células madre de pulpa dental de dientes deciduos (Chai *et al.*, 2000). De igual manera la investigación en CMA presente en pulpas de dientes permanentes (DPSCs), ha representado gran interés. Evidencia recolectada de su capacidad en la regeneración del complejo dentino-pulpar, permite que sean clasificadas como CM multipotentes, por la capacidad de diferenciar a grupos celulares de su misma fuente germinativa. En cultivo DPSCs, adquieren de igual manera que las SHED morfología fibroblastoide y a través de estudios de inmunohistoquímica su positividad a los anticuerpos STRO-1, CD44, CD73, CD105 y CD271 (Chang *et al.*, 2005).

Cinco grupos de CMM han sido descritos en cavidad bucal, posteriormente al descubrimiento de las DPSCs se realizaron investigaciones que concluyeron con el

descubrimiento de nuevas fuentes que involucraban más tejidos provenientes de esta región (Tabla IV).

Tabla IV
Fuentes de Obtención de CMM en Cavidad Bucal

Dientes Temporales	Células madre en pulpas de dientes temporales (SHED)
Dientes Permanentes	Células madre en pulpas de dientes permanentes (DPSCs)
Ligamento Periodontal	Células madre presentes en espacios periodontales (PDLSCs)
Folículo Dental	Células madre presentes en el folículo dental (DFSCs)
Mucosa Bucal	Células madre de la mucosa bucal
Bola de Bichat	Células madre presentes en tejido adiposo de Bichat

* (Iohara *et al.*, 2006; Robey *et al.*, 2006)

2.4 Diferenciación a linajes neuronales a partir de células SHED

Las células madre provenientes de dientes deciduos exfoliados, derivan de las células de la cresta neural, provenientes de la placa neural del ectodermo, por lo que presentan una fuente potencial de diferenciación a linajes derivados del sistema nervioso (Morsczeck *et al.*, 2010).

Debido a su origen embrionario, su capacidad pluripotente, ha sido revisada para la diferenciación hacia linaje neuronal, debido a la necesidad de establecer terapias efectivas para la regeneración de este tejido, en las distintas alteraciones que se puedan presentar. Las SHED probaron ser una prometedora fuente de células madre para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Wang *et al.*, 2010).

En cultivo las células mostraron tempranamente la morfología fibroblástica característica de las células madre pero tras la administración de factores de crecimiento, fue posible observar la transformación morfológica celular a estructuras multipolares con extensiones periféricas como procesos membranosos característicos de células neuronales (Nourbakhsh *et al.*, 2011).

Con un estudio de reciente fecha fue puesta a prueba la capacidad de las SHED en la regeneración de lesiones traumáticas de la medula espinal, utilizando como modelo animal ratas hembra Sprague-Dawley a las cuales se les realizó una laminectomía (extracción de lámina del hueso vertebral) consecutivamente a esto se hizo una transección provocada de la medula espinal con hoja de bisturí, con una extensión de 1-2 mm a nivel de las vértebras torácicas 9-11, en los extremos de la lesión se inyectaron las células SHED (previamente extraídas y aisladas de la pulpa dental de infantes de 6 a 12 años de edad), el espacio de la lesión fue rellenado con las mismas células SHED embebidas en una matriz de fibrinógeno y trombina. Todo este procedimiento fue guiado con inmunosupresión y antibioticoterapia. Este trasplante celular fue comparado con los trasplantes realizados con células madre de medula ósea y el trasplante de fibroblastos provenientes de piel. Los resultados obtenidos fueron alentadores, durante la fase aguda de la lesión y después de un periodo de recuperación de 5 semanas, las ratas trasplantadas con SHED fueron capaces de ejercer movimientos articulares, apoyar sus extremidades posteriores, caminar sin soporte de peso además exhibieron una regeneración superior de neurofilamentos, inhibieron la inducción a apoptosis de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, acción característica ante un estado de extrema lesión, promovieron la regeneración axonal y por último reemplazaron la pérdida celular diferenciándose a oligodendrocitos. Contundentemente mostraron un comportamiento altamente proliferativo, regenerativo y de diferenciación mayor al de los trasplantes realizados con otros grupos celulares (Sakai *et al.*, 2012).

2.5.-Células Mesénquimales de Pulpa Dental de Dientes Deciduos y Permanentes empleadas para terapia en Alteraciones del Sistema Nervioso

Distintas terapias han sido propuestas para promover la sobrevivencia de las células neuronales así como también el crecimiento axonal tras una lesión de nervios periféricos o neuropatía.

Las neuropatías pueden ser manifestadas con dolor hasta la pérdida completa de actividad motora y sensitiva, entre los tratamientos que han sido manejados principalmente se pueden encontrar el uso de corticoesteroides para atenuar el dolor e inflamación posterior a la lesión así como también la inclusión de complejo B y finalmente microcirugía de nervios periféricos, debido a su cuestionada eficacia han debido ser buscadas nuevas alternativas para esta condición entre las que se han podido proponer la ingeniería de tejidos en base a biomateriales como fibrina y colágeno, así como también la inclusión de factores de crecimiento entre los que se encuentran el factor de crecimiento neuronal NGF, factor neurotrófico derivado del cerebro BDNF, neurotrofinas NT-3 y también la más prometedora hasta el momento por sus capacidades ya mencionadas de reparación y regeneración de tejidos que ha sido la terapia celular en base a células madre (He y Jin, 2016).

3.-JUSIFICACIÓN

Procesos patológicos en los nervios periféricos que involucran la región maxilar y mandibular, pueden presentarse posterior a la realización de diversos tratamientos odontológicos, tal como es el caso de la Neuralgia del Trigémino.

Las opciones terapéuticas existentes, en su mayoría no logran el objetivo de una reparación nerviosa óptima o representan un tiempo de espera prolongado para la recuperación del paciente.

La regeneración de tejidos a partir de Células Mesénquimales, aisladas de diversas fuentes del cuerpo humano, incluyendo Tejido Pulpar de Dientes Deciduos, representa una alternativa prometedora para el tratamiento de alteraciones neurales en la región maxilofacial, de fácil obtención y sin compromisos éticos en su manejo.

4.-HIPÓTESIS

Las Células Mesénquimales de tejido Pulpar de Dientes Deciduos, aisladas por separación magnética con anticuerpo SSEA-4, presentan capacidad de Morfodiferenciación e Histodiferenciación a Linaje Neuronal.

5.-OBJETIVOS

5.1.-Objetivo General

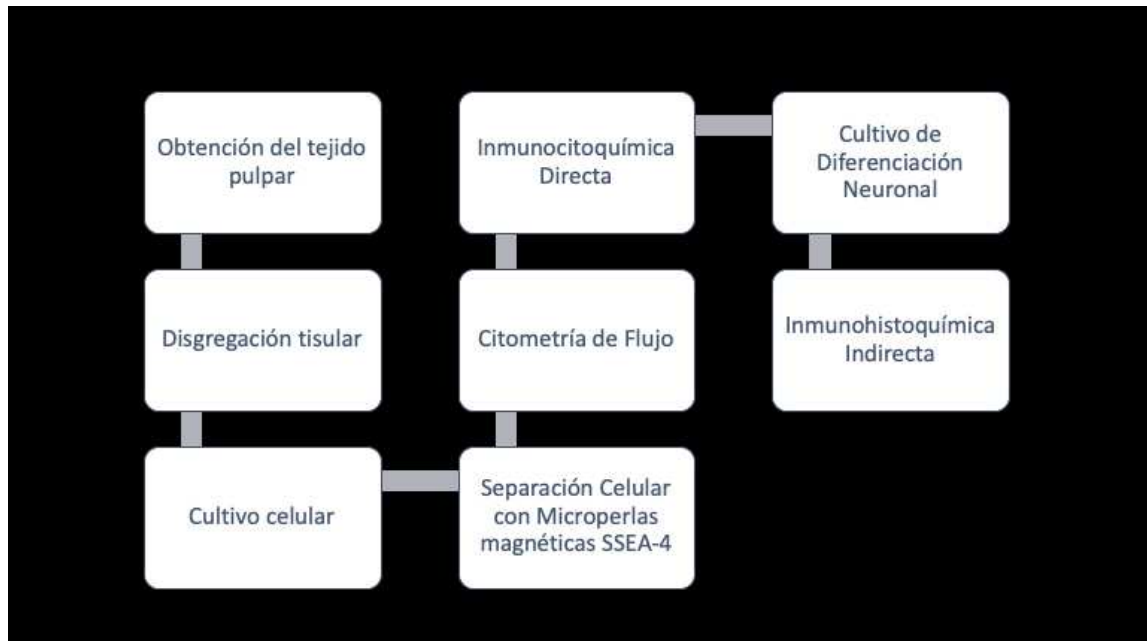
- Analizar la capacidad de morfodiferenciación e histodiferenciación a Linaje Neural de Células Mesénquimales de Dientes Deciduos, obtenidas a partir de Separación Magnética con anticuerpo SSEA-4.

5.2.-Objetivos Específicos

- Estandarizar el Cultivo Primario de Células Mesénquimales de Pulpa Dental Humana de Dientes Deciduos.
- Identificar Células Mesénquimales de Pulpa Dental Humana de Dientes Deciduos positivas a el anticuerpo SSEA-4. No es objetivo, es metodológico
- Caracterizar e Identificar la población celular mediante Citometría de Flujo e Inmunocitoquímica Directa.
- Producir Neuroesferas a partir de Células Mesénquimales de Pulpa Dental Humana de Dientes Deciduos.
- Estandarizar Cultivo de Diferenciación a partir de Células Mesénquimales de Pulpa Dental Humana de Dientes Deciduos.
- Analizar la expresión de los Marcadores Neuronales, Nestina β -III Tubulina y GFAP través de Inmunocitoquímica Indirecta.

6.-MATERIAL Y MÉTODOS

6.0 Diagrama de Estrategia Experimental



6.1 Obtención del Tejido Pulpar

Para la obtención de las muestras pulpares, se obtuvieron 40 dientes deciduos provenientes de infantes de entre 6 a 10 años de edad. Se trabajó, bajo autorización del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.1.1 Criterios de Selección Establecidos

Criterios de Inclusión: Pacientes ASA I, ambos sexos, infantes sin datos clínicos patológicos, de entre 6 y 10 años de edad, que los padres o tutores aceptarán la participación de su hijo(a) en el estudio y firmaran carta de consentimiento informado. Las muestras dentales debían encontrarse sanas como gérmenes dentarios resultados de enucleación, órganos dentarios en estado de exfoliación, órganos dentarios candidatos a extracción por tratamiento ortodoncico u ortopédico.

Criterios de Exclusión: pacientes que presentarán alguna enfermedad, infantes menores de 6 años y mayores de 10, que los padres no aceptarán la participación de su hijo(a) en el estudio y no firmaran carta de consentimiento informado, órganos dentarios sanos a los cuales no se indicara extracción por tratamiento ortodoncico u ortopédico, órganos dentarios que presentaran alguna patología.

6.1.2 Extracción de Órganos Dentales

El estudio se realizó en un total de 40 órganos dentarios, llevando un ensayo exclusivo por muestra de paciente. Las indicaciones dadas a cada participante (paciente-padre-tutor) en el estudio fueron: realizar profilaxis dental en consultorio una semana antes de la toma de muestra, cepillado dental diario 3 veces al día y dieta baja en carbohidratos.

El día de la toma de muestra se realizó un segundo profiláctico y limpieza directa sobre la superficie dentaria con gasa humedecida en Clorhexidina al 2% (Consepsis-Ultradent) durante 5 minutos. Las muestras dentales obtenidas, fueron trasportadas al laboratorio, en tubos falcon de 50 ml (Corning) con PBS1X, 100µg/mL Estreptomicina, 100U/mL Penicilina y 0.25mg/mL Anfotericina B (Sigma). (Figura 1)

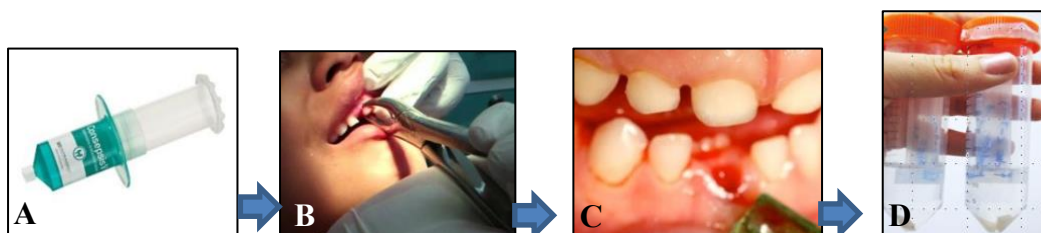


Figura 1. Protocolo para toma de muestras dentales. A) solución de clorhexidina al 2% utilizada como profilaxis previa al procedimiento quirúrgico. B) extracción atraumática del organo dentario. C) lecho quirúrgico. D) transporte de organos dentarios en medio con antibioticos y antimicótico.

6.1.3 Extracción de Pulpa Dental

En las muestras dentales extraídas, se realizó odontosección a nivel de la unión amelocementaria (límites de corona y raíz dental) utilizando un disco de diamante grano mediano (NTI), montado en micromotor eléctrico de baja velocidad (Dremel), acompañado de constante irrigación con Solución Fisiológica estéril 0.9% (Pisa). En las

muestras que presentaron ápice radicular abierto, se tomó éste como acceso para retirar el tejido pulpar con excavadores dentinarios y limas de endodoncia No.20 Triple Flex (Kerr). Posteriormente, el tejido pulpar extraído fue colocado en tubos de 2mL (Eppendorf) con 1mL de PBS 1X, 100µg/mL Estreptomicina, 100U/ml Penicilina y 0.25mg/mL Anfotericina B (Sigma) y preservado en refrigeración a 4°C sin exceder las 48 horas postextracción (Figura 2).

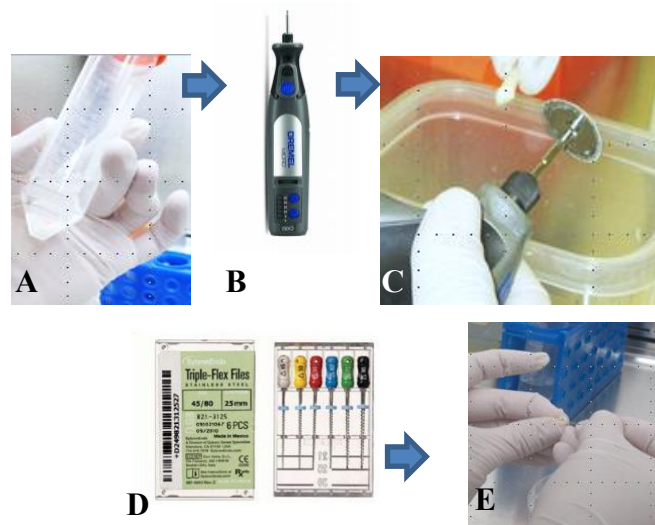


Figura 2. Obtención de tejido pulpar humano apartir de dientes deciduos. A) organos dentarios en medio con antibioticos y antimicotico. B) micromotor de baja velocidad empleado para realizar odontosección C) remoción de tejido duro del diente (odontosección) para acceder a la pulpa dental. D) limas de endodoncia No.20 Triple Flex (Kerr). E) retiro de tejido pulpar mediante lima de endodoncia No. 20, realizando instrumentación manual.

6.2 Disgregación tisular

6.2.1 Disgregación mecánica

El tejido pulpar obtenido, se disgregó en Disociador Mecánico (gentleMACS/ Miltenyi Biotec) colocando en tubo C (Miltenyi Biotec) se adicionaron 4.7 mL de PBS 1X, para posteriormente, llevarlo al disociador bajo el programa de disgregación D, concluido el programa, la muestra fue centrifugada a 300xg durante 10 minutos (Figura 3).

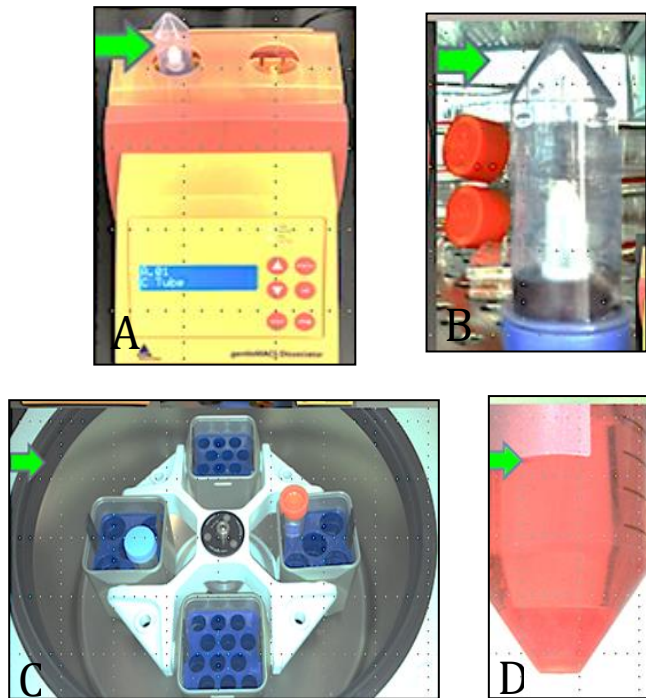


Figura 3. Proceso de disgregación tisular. A) disociador mecánico gentleMACS empleado para realizar la disgregación mecánica de tejido pulpar. B) tubo C (Miltenyi Biotec) su conformación interna con aspás, permite realizar con mas falicidad la disgregación mecánica. C) centrifugación a 300xg. D) obtención de pellet y sobrenadante celular.

6.2.2 Disgregación Enzimática

Obtenido el pellet celular, se adicionaron 3mg/mL de Colagenasa tipo I (Sigma) y 4mg/mL de Dispasa (Sigma), se incubo por 30 min a 37°C, pasado el tiempo de incubación, se centrifugo la suspensión a 300xg durante 10min, se retiró el sobrenadante e inactivaron las enzimas lavando con 5mL de medio DMEM F12 (Gibco) y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco), posteriormente, la suspensión se filtró en membrana de 80 μ m (Milipore), finalmente se resuspendió en 1mL de medio de cultivo (Figura 4).

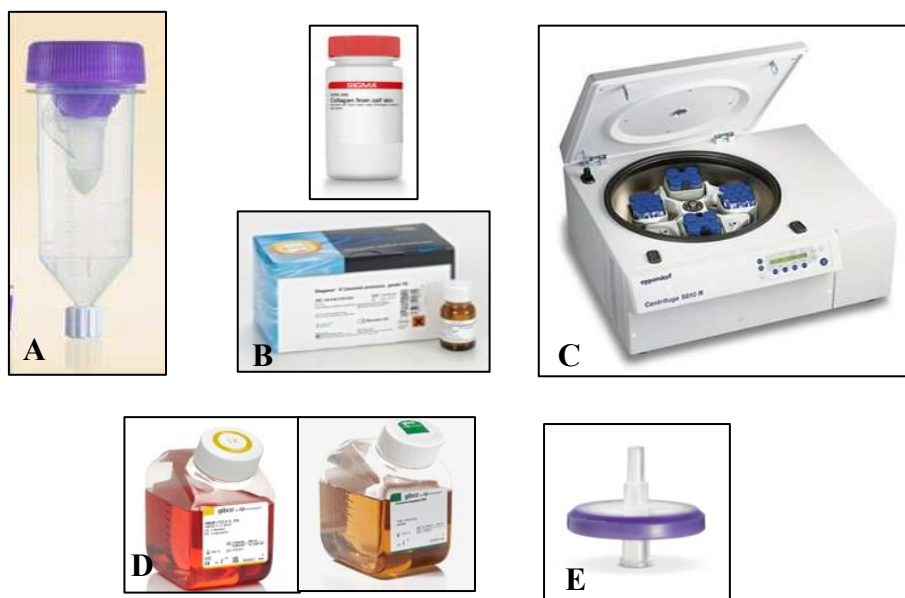


Figura 4. Disgregación Enzimática. A) tubo C (Miltenyi Biotec). B) enzimas dispasa y colagenasa utilizadas en la disgregación del tejido pulpar a 37°C en cámara de CO₂. C) centrifugación de la suspensión a 300xg durante 10min para la obtención del pellet celular. D) DMEM F12 (Gibco) y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco) utilizados para bloqueo de la disgregación enzimática. E) membrana de 80 μ m (Milipore).

6.3 Conteo Celular en Cámara de Neubauer o Hematocitómetro

Para determinar la cantidad de células presentes en cada muestra y su viabilidad, se realizó, ensayo en Hematocitómetro o Cámara de Neubauer (Marienfeld), con micropipeta (Eppendorf) previo a homogenizar, se tomaron 10µl de la suspensión celular, y 10µl de Azul Tripán al 0.05% (Sigma). Los 20µl obtenidos, fueron mezclados en tubo de 2mL (Eppendorf) y colocados en Cámara de Neubauer para ser contabilizados en Invertoscopio con Contraste de Fases (Figura 5).

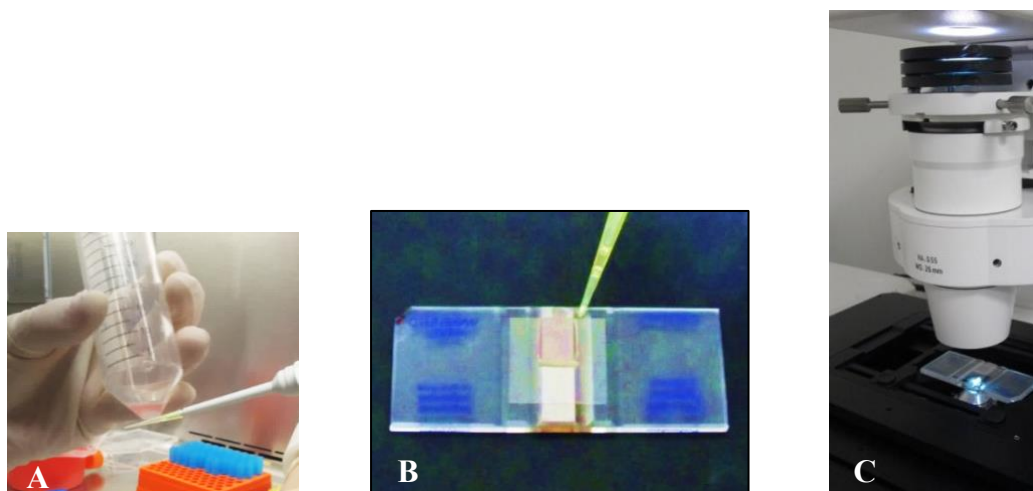


Figura 5. Cuantificación celular. A) pellet celular obtenido posteriormente del proceso de disgregación mecánica y enzimática. B) Cámara de Neubauer, se depositaron 10µl de la suspensión celular, y 10µl de Azul Tripán al 0.05% (Sigma) para cuantificación e identificación de células vitales. C) cuantificación de células en invertoscopio en modalidad de contraste de fases.

6.4 Cultivo Celular

6.4.1 Medio de Crecimiento

Como Medio de Crecimiento (MCr) para el Cultivo Celular Primario (CCP), se utilizó, DMEM-F12, Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco) al 10%, 100µg/mL Estreptomicina, 100U/ml Penicilina y 0.25µg/mL Anfotericina B (Sigma). La suspensión celular, previamente contabilizada, se resuspendió en 5mL de MCr, y se colocó en frascos falcon para cultivo celular de 25cm² (Corning).

Para la expansión del CCP, se mantuvo en Cámara de CO₂ a 5% en 37°C (Thermo Scientific), trascurridas 72 horas se procedió a eliminar células no adherentes, realizando cambio de MCr, el cual fue renovado cada 3 días. Al observarse en Microscopio Invertido una confluencia en crecimiento del 80% aproximadamente, se realizó Tripsinización de las células, para lograr su multiplicación y expansión, esto hasta 3^{er} pase celular.

6.4.2 Tripsinización Celular

Para tripsinizar las células en confluencia, se utilizó, 0.25% de Tripsina y 1mM EDTA (Fisher Scientific). Retirado el MCr, las células adheridas en el frasco de cultivo, fueron lavadas 3 veces con PBS 1X, se agregó la solución de Tripsina/EDTA (Fisher Scientific) y se llevaron a incubación durante 5 minutos a 37°C en Cámara de CO₂ a 5% (Thermo Scientific), transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a inactivar la enzima con MCr, en igual proporción de volumen que el contenido en el frasco, para después centrifugar a 300 xg durante 10 minutos. (Eppendorf 5804).

6.4.3 Expansión Celular

Posterior a la cuantificación de las células viables, en Cámara de Neubauer, el pellet celular obtenido, se resuspendió en 15mL de MCr y sembrado en frasco de cultivo de 75 cm², para crecimiento y multiplicación celular, en Cámara de CO₂ 5% a 37°C. El MCr fue cambiado cada 3 días, hasta lograr el 80% de crecimiento en el frasco de cultivo (Figura 6).

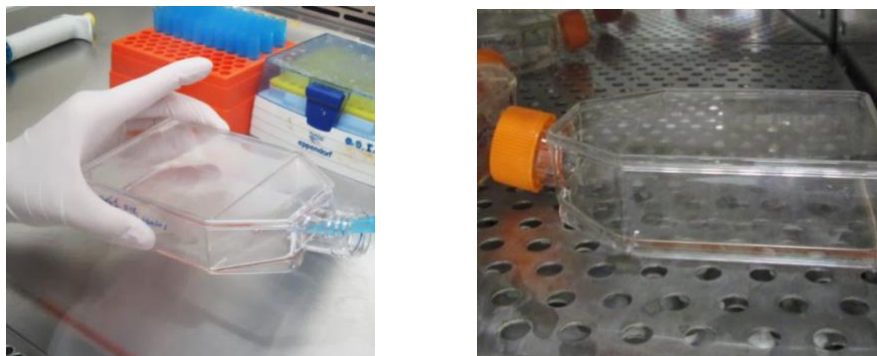


Figura 6. Expansión de cultivo primario. Las Células Mesénquimales de Pulpa Dental de Dientes Deciduos en segundo pasaje celular, fueron llevadas a frascos de 75cm² (Corning). La expansión se realizó en MCr.

6.5 Separación celular con Microperlas Magnéticas conjugadas con anticuerpo SSEA-4

La separación de Células Mesenquimales de Pulpa Dental de Dientes Deciduos, a partir del CCP, fue realizada por Inmunoseparación Magnética, utilizando MACS® Separador Magnetico (Miltenyi Biotec). Obteniendo la confluencia esperada (3×10^6) del 80% en pase 2, las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en MCr y centrifugadas, para después ser resuspendidas en PBS1X con 1% de Albumina Sérica Bovina (BSA) (Sigma-Aldrich). Microperlas magnéticas de 50nm, conjugadas con el anticuerpo SSEA-4 (MACS/Miltenyi Biotec) fueron incubadas con la suspensión celular, durante 15 minutos a 4°C.

Para realizar la Inmunoseparación Magnética, se colocó una Columna MS (MACS/Miltenyi Biotec) compuesta por una matriz de esferas ferromagnéticas (microperlas magnéticas), sobre el Separador, (estas esferas amplían el campo magnético 10,000 veces lo que induce un gradiente alto dentro de la columna), bajo la columna en 3 tiempos, se colocaron tubos 15mL (Corning), con el fin de recuperar las fracciones celulares, negativa, positiva y el contenido de lavados realizados durante cada separación. La Columna MS (MACS/Miltenyi Biotec), se lavó 3 veces, con 1mL de PBS 1X, posteriormente se colocó la suspensión celular en dicha columna, se realizaron 3 lavados de 1mL con PBS 1X, la fracción celular obtenida de los lavados, fue la fracción negativa al anticuerpo SSEA-4, a continuación, la Columna MS fue retirada del Separador Magnético. El embolo se introdujo dentro de la Columna MS, y se recolecto el contenido

en tubo de 15mL (Corning), con el fin de recuperar la fracción positiva al anticuerpo SSEA-4 (Figura 7).

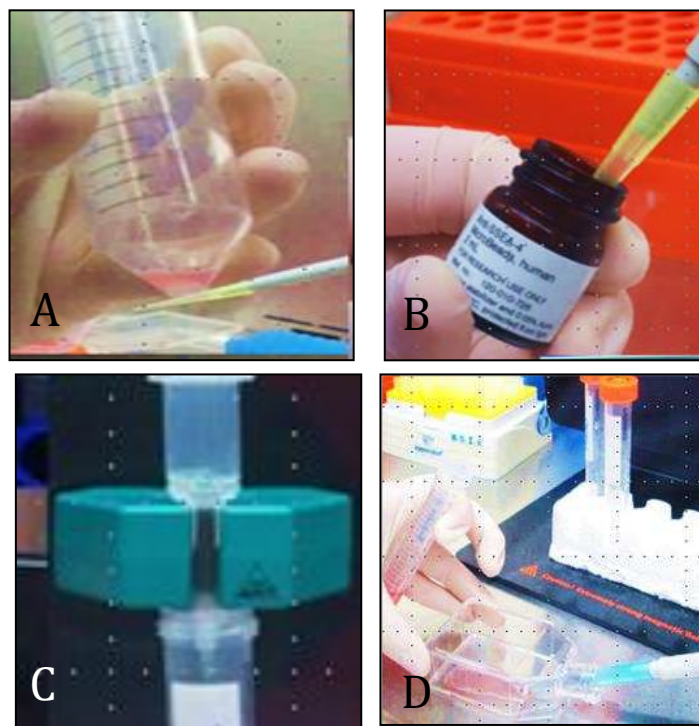


Figura 7. Separación con microperlas magnéticas conjugadas con anticuerpo SSEA-4, para la obtención de células mesénquimales multipotentes. A) pellet celular 3×10^6 . B) anticuerpo SSEA-4 conjugado con microperlas magnéticas. C) Columna MS (MACS/Miltenyi Biotec), columna ferromagnética, utilizada en la obtención de la fracción celular positiva al anticuerpo SSEA-4. D) siembra de fracción positiva celular en MCr.

6.6 Citometría de Flujo

Se realizó tinción para Citometría de Flujo, con los anticuerpos CD45FITC, CD14PE (presentes en CMH), CD13PE, CD44FITC y CD105PE (presentes en CMM) con el fin de identificar y estudiar la población de células colectadas en la fracción positiva al anticuerpo SSEA-4.

Para la identificación de cada anticuerpo, se resuspendieron 1×10^6 células en 100µl de Buffer de tinción, cada muestra fue teñida con 20µl de anticuerpo correspondiente, CD45FITC, CD14PE, CD13PE, CD44FITC y CD105PE. Las muestras se incubaron en oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, a cada tubo se agregó 1mL de PBS 1X y se centrifugaron a 300xg durante 10

minutos. Finalmente el pellet celular, se resuspendió en 200ml de paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma-Aldrich) para ser analizadas en Citómetro de Flujo (Miltenyi MACSQuant) (Figura 8).

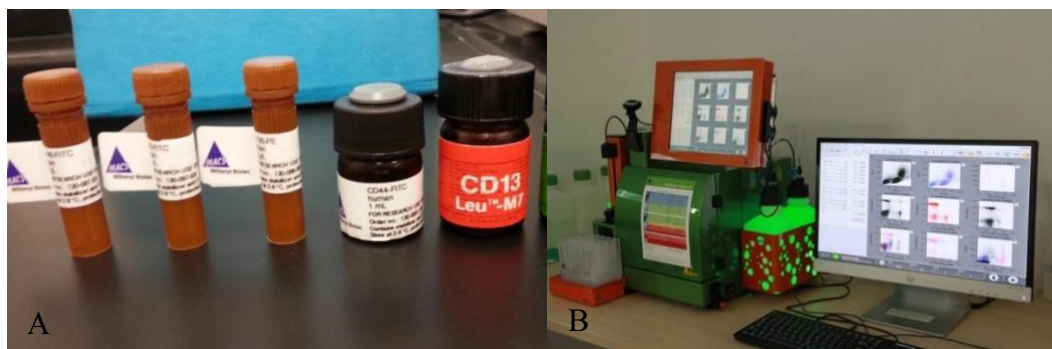


Figura 8. Identificación de Células Mesenquimales por Citometría de Flujo. A) anticuerpos correspondiente para identificación de células mesenquimales y discriminación de células hematopoyéticas, CD45FITC, CD14PE, CD13PE, CD44FITC y CD105PE. B) Citómetro de Flujo (Miltenyi MACSQuant)

6.7 Inmunocitoquímica Directa

Para la identificación de marcadores presentes en células mesenquimales, se realizó inmunohistoquímica con anticuerpos primarios. Las células fueron sembradas en portaobjetos con cámara de 16 pocillos para cultivo de células (Nunc™ Lab-Tek). El medio de cultivo, fue retirado una vez que las células alcanzaron la confluencia del 80% dentro de cada pocillo, se realizó lavado con PBS1X y colocó metanol a -2°C durante 10 minutos para fijar las células, posteriormente, fueron incubadas a temperatura ambiente con PBS1X y BSA al 2% durante 30 minutos.

Pasados los 30 minutos, los Anticuerpos a identificar fueron colocados, siendo incubados por 3 horas, a temperatura ambiente y en oscuridad. (Tabla V) (Figura 9)

Tabla V

Anticuerpos Monoclonales empleados para Identificación de Marcadores de Membrana presentes en Células Mesénquimas

Origen	Antígeno	Casa Comercial
Ratón	CD44FITC	Miltenyi Biotec
Ratón	CD71FITC	Miltenyi Biotec
Ratón	CD90FITC	Miltenyi Biotec
Ratón	CD146FITC	Miltenyi Biotec
Ratón	CD13PE	Miltenyi Biotec
Ratón	CD105PE	Miltenyi Biotec

*FITC: Fluoresceína-5-Isotiacino, PE: Phycoerytrina

Completado el tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con PBS1X. Para identificar los ácidos nucleídos, se adiciono 1:1000 DAPI (Sigma-Aldrich), dejando incubar por 15 minutos en oscuridad, posteriormente, se realizó un lavado con PBS1X. Concluida la tinción, se procedió a retirar la estructura de las cámaras de los porta objetos, agregando después, 10µl de solución de montaje (Dabco) colocando cubreobjetos, en cada campo a analizar. Para retirar el excedente, durante 24 horas, sé dejó que la solución de montaje drenara a través del cubreobjetos, finalmente, los cubreobjetos se sellaron con esmalte sobre el portaobjetos, y se realizó análisis con Microscopio Invertido de Fluorescencia (Carl Zeiss, Z1).



Figura 9. Anticuerpos Monoclonales para Inmunocitoquímica Indirecta. Para la técnica de identificación de anticuerpos presentes en células mesénquimales, fueron empleados portaobjetos con cámara de 16 pocillos para cultivo de células (Nunc™ Lab-Tek) así como también los Anticuerpos Monoclonales. CD44-FITC, CD71FITC, CD90FITC, CD146FITC, CD13PE y CD105PE.

6.8 Cultivo de Diferenciación Neuronal

Para realizar la diferenciación Neuronal, el protocolo, fue dividido en dos etapas, llevadas en distintos medios de cultivo, Medio Neuronal A (MNA): medio de pre-inducción, fue utilizado para mantener la multipotencialidad, crecimiento y división de Neuroesferas a partir de células SHED. Medio Neuronal B (MNB): dirigido a la diferenciación celular.

6.8.1 Medio Neuronal A

Los componentes empleados para el medio de pre-inducción, fueron: medio DMEM-F12(Gibco), 50µl/mL Suplemento (Gibco), 2% SFB (Gibco), 3µl/mL L-glutamina (Gibco), 20ng/mL Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), 20ng/mL Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), 100µg/mL Estreptomicina, 100U/mL Penicilina y 0.25mg/mL Anfotericina B (Sigma-Aldrich).

Las células previamente separadas por microperlas magnéticas, conjugadas con anticuerpo SSEA-4, fueron colocadas en MCr en frasco de cultivo de 25cm² (Corning) para su expansión. Al realizar el 2do pase celular, fueron tripsinizadas y sembradas en 5mL de MNA, esperando la formación de Neuroesferas, en etapa de pre-inducción durante 7 días. La mitad del medio fue recambiado cada 3 días.

6.8.2 Medio Neuronal B

Los componentes empleados para el medio de diferenciación celular, fueron: medio Neurobasal (Gibco), 70µl/mL Suplemento B27, 3µl/mL L-glutamina (Gibco), 500nM Ácido Retinoico (Sigma Aldrich), 100µg/mL Estreptomicina, 100U/mL Penicilina y 0.25mg/mL Anfotericina B (Sigma-Aldrich). Las células se mantuvieron en MNB, durante 7 días, la mitad del medio fue cambiado cada 3 días.

Las células fueron sembradas en portaobjetos con cámara de 2 pocillos para cultivo celular (NuncTM Lab-Tek) (Figura 10), para adherencia de las células, la superficie de los portaobjetos, fue preparada con 0.1mg/mL de Poly-L-Lysina (Sigma-Aldrich). En cada pocillo se agregaron 60µl, manteniendo en incubación durante 12 horas a 37°C,

posteriormente, se retiró sobrenadante y cada pocillo se lavó con 500ml de agua bidestilada milli-Q (mQ), seguidamente, las células fueron sembradas en 400µl de MNB, se mantuvieron en cultivo durante 7 días, la mitad del medio fue cambiado cada 3días.



Figura 10. Portaobjetos con cámara de 2 pocillos. Para la mejor adherencia celular, previo a establecer el cultivo, la superficie del portaobjetos fue tratada con poly-L-Lysina. (Nunc™ Lab-Tek).

6.9 Inmunohistoquímica Indirecta

Transcurridos 7 días en MNB, se procedió a identificar Marcadores Neuronales por medio de Inmunohistoquímica Indirecta, con los anticuerpos secundarios para Nestina, proteína presente en neurofilamentos de células precursoras neurales, B-III Tubulina (Tuji-1), proteína presente en el desarrollo y maduración del sistema nervioso humano y Proteína Fliofibrilar Ácida (GFAP), la cual se encuentra en filamentos intermedios del citoesqueleto celular, en particular de células gliales (Tabla VI).

Tabla VI

Titulación de Anticuerpos empleados para Inmunohistoquímica Indirecta

Origen	Antígeno	Dilución-Titulación	Casa Comercial
Ratón	Nestina	1:250	Life Technologies
Conejo	Alexa 568	1:500	Life Technologies
Ratón	Tuji-1	1:800	Life Technologies
Conejo	Alexa 568	1:500	Life Technologies
Ratón	GFAP	1:500	Life Technologies
Conejo	Alexa 568	1:1000	Life Technologies

Una vez que las placas de cultivo fueron observadas en microscopio de contraste de fases, se procedió a retirar el MNB y se realizó lavado con 400µl PBS1X, las células fueron fijadas con metanol a -2°C durante 10 minutos, se retiró sobrenadante, y se realizaron 2 lavados con PBS1X. Para permeabilizar la membrana celular, se adicionó tritón X-100 al 0.5% y se incubó durante 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS1X. La solución de Bloqueo (Suero Fetal de Cabra (SFC) al 10% en PBS1X) fue agregada, e incubada durante 1 hora a temperatura ambiente, para evitar reacciones inespecíficas.

Para la dilución-titulación de Anticuerpos, se preparó SFC al 1% en PBS1X, adicionando los anticuerpos primarios (ratón-anti-humano) Anti-Nestina, Anti-B-III Tubulina y Anti-GFAP (titulaciones especificadas en tabla). La incubación fue por 12 horas (durante la noche) a 4°C. El sobrenadante fue retirado al siguiente día, y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS1X, posteriormente, fueron agregados los anticuerpos secundarios Anti-Nestina, Anti-B-III Tubulina y Anti-GFAP (anticuerpos conjugados con Alexa Fluor 568) (conejo-anti-ratón) (titulaciones especificadas en tabla). Prosiguió incubación de 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, 3 lavados de 5 minutos con PBS1X, fueron realizados.

La tinción del núcleo celular, se adicionó 1:1000 DAPI (Sigma-Aldrich), dejando incubar por 10 minutos en oscuridad, un vez retirado el DAPI, se realizó un lavado con PBS1X. Concluida la tinción con anticuerpos primarios y secundarios, se procedió a retirar la estructura de las cámaras de los porta objetos, agregando después, 10µl de solución de montaje (Dabco) y se colocaron cubreobjetos, en cada campo a analizar. Para retirar el excedente, durante 24 horas, solución de montaje drenó a través del cubreobjetos, finalmente, los cubre objetos fueron sellados con esmalte sobre el portaobjetos, y se realizó análisis con Microscopio Invertido de Fluorescencia (Carl Zeiss, Z1).

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de Muestras Biológicas a partir de Órganos Dentarios

Se obtuvieron 40 muestras de pulpa dental de dientes deciduos, de pacientes entre 6 y 9 años de edad, de los cuales 19 provenían de donantes femeninos y 21 donantes masculinos (Tabla VII). Los padres o tutores dentro del estudio, de los menores de edad donantes de muestras biológicas, previo a explicación, firmaron el consentimiento informado.

Los órganos dentarios, fueron producto de enucleaciones dentales (procedimiento que consiste en la extracción del germen de los premolares permanentes, antes que se lleve a cabo la erupción normal de éstos, con el fin de evitar malposiciones) así también órganos dentarios en estadio de exfoliación y órganos dentarios extraídos seriadamente.

Debido a la alta concentración de bacterias que habitan en la región oral, se estableció protocolo de manejo de tejido pulpar, para transporte y desinfección de las muestras.

Tabla VII
Características de las Muestras Obtenidas para el Estudio

Edad	F	M	Diente Exfoliado	Extracción Seriada	Germen Enucleado	Total
6-7	10	8	18			18
8-9	9	13	4	8	10	22
Total	19	21	22	8	10	40

La mayoría de órganos dentarios, obtenidos para el estudio, fueron de pacientes masculinos, el rango de edad más incidente fue de 8-9 años y el motivo principal de la donación fue debido a la Exfoliación de Dientes.

7.2. Cultivo Celular Primario

Se obtuvo cultivo celular primario a partir de pulpa dental de dientes deciduos y para su expansión se mantuvo en MCr.

7.2.1 Conteo de células viables en Cámara de Neubauer

La cantidad promedio de células obtenidas de dientes exfoliados y extracción seriada fue de 50,000 células viables por muestra y la obtenida de germen enucleados promedio fue de 80,000. Identificado a partir de la tinción de Azul Tripano.

7.2.2 Ritmo de División de la Población Celular

El tiempo de duplicación de la población calculado, para las células de pulpa dental humana fue de 21.89 horas.

7.2.3 Análisis Morfológico

Las células mostraron crecimiento adherente al frasco de cultivo. Apariencia heterogénea en forma y tamaño, morfología fusiforme, prolongaciones citoplasmáticas en su mayoría, alargadas, delgadas y muy ramificadas, núcleos ovoides y citoplasma escaso. En MCr, buscaron contacto para formar uniones y con ello crecimiento en colonias. Mostraron una rápida expansión, al llegar a la confluencia en el frasco de cultivo del 80% el día 10 y al 100% el día 14. Tres pases celulares fueron realizados y en cada uno, el ritmo de expansión fue incrementado (Tabla VII) (Figura 11).

Tabla VIII

Pase celular en relación con porcentaje de Expansión*

Pase Celular	Confluencia al 100%
P0	Día 14
P1	Día 10
P2	Día 7
P3	Día 5

*Apreciación de crecimiento celular apartir de un promedio de 50,000 células

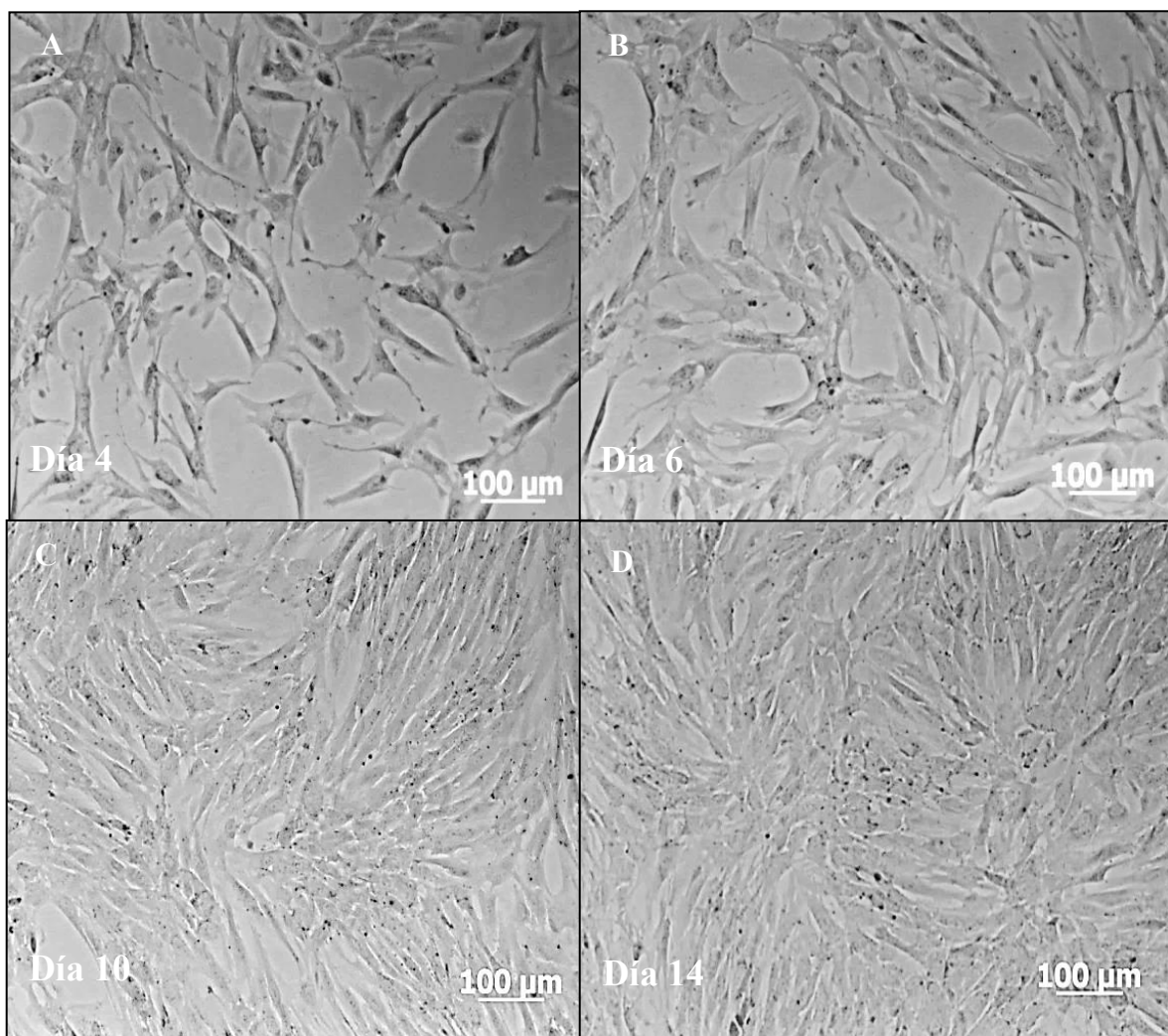


Figura 11. Microfotografías obtenidas con Microscopio de Contraste de Fases. Cultivo Inicial –Pase 0 (PO) Células de Pulpa Dental de Dientes Deciduos en MCr. A) 50% de confluencia, B) 60% de confluencia, C) 70% de confluencia, D) 80% de confluencia.

7.3. Células Mesénquimales de Pulpa Dental Humana de Dientes Deciduos positivas a Separación Magnética con Anticuerpo SSEA-4

Del ensayo de separación magnética con microperlas magnéticas SSEA-4 fue posible la obtención de células mesénquimales positivas a el anticuerpo SSEA-4, las que en MCr, mostraron un comportamiento adherente al frasco de cultivo, morfología homogénea en tamaño y forma espigada, núcleo ovoide, escaso citoplasma, crecimiento característico en colonias o Unidades Formadoras de Colonias (CFUs) (100 células aproximadamente por CFU) y tasa de expansión alta, similar a la del cultivo no purificado. (Figura 12)

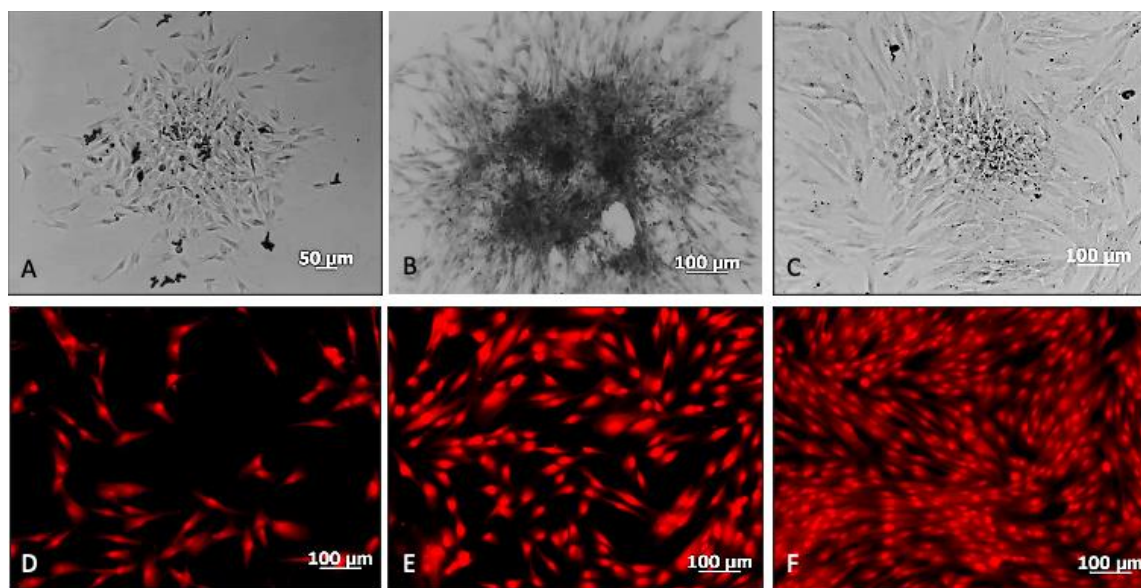


Figura 12. Cultivo de Células Mesénquimales de Pulpa Dental de Dientes Deciduos, positivas al anticuerpo SSEA-4. A, B, C: Microfotografías obtenidas con Microscopio de Contraste de fases, los días 3, 5 y 7, de cultivo en MCr, donde se muestra la organización y crecimiento de las células, en Unidades Formadoras de Colonias. D, E, F: Microfotografías obtenidas con Microscopio Invertido de Fluorescencia, donde se muestra ensayo de Autofluorescencia con formalina, los días 3, 5 y 7, de cultivo en MCr para evidenciar patrón de crecimiento en CFUs y morfología celular homogénea.

7.4 Analisis de resultados en Citometría de Flujo

Las Células Mesénquimales de Pulpa Dental de Dientes Deciduos, positivas al anticuerpo SSEA-4, por medio de Citometría de Flujo, mostraron un inmunofenotipo positivo a los marcadores de membrana CD44, CD105, CD13 (característicos de células mesenquimales), por otra parte, se identificó la negatividad en los marcadores de membrana CD45 y CD14 (característicos de células hematopoyéticas). (Tabla IX) (Figura 13)

Tabla IX
Inmunofenotipo Células SHED

Marcador de Membrana	Expresión	Inmunofenotipo
CD44FITC	(+)	CMM
CD105PE	(+)	CMM
CD13PE	(+)	CMM
CD14PE	(-)	CMH
CD45FITC	(-)	CMH

*CMM: Célula Madre Mesénquimal, CMH: Célula Madre Hematopoyética

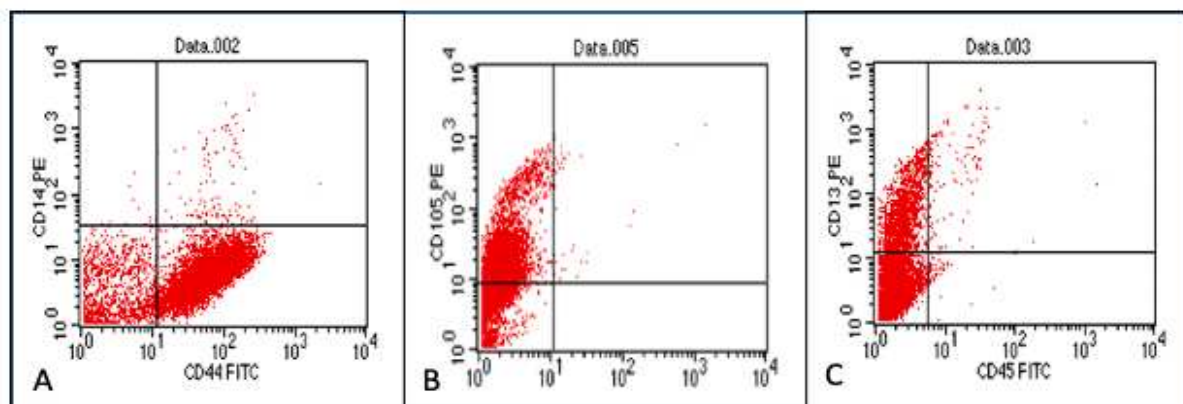


Figura 13. Dot Plots obtenidos con Citómetro de Flujo (Miltenyi MACSQuant). A) Población celular homogénea CD14 (-), CD44 (+), B) Población celular homogénea CD105 (+), C) Población celular homogénea CD13 (+), CD45 (-).

7.5 Inmunocitoquímica Directa

La caracterización de población celular, por inmunocitoquímica, fue positiva para los marcadores de membrana identificados con mas frecuencia en células mesénquimales (Figura 14).

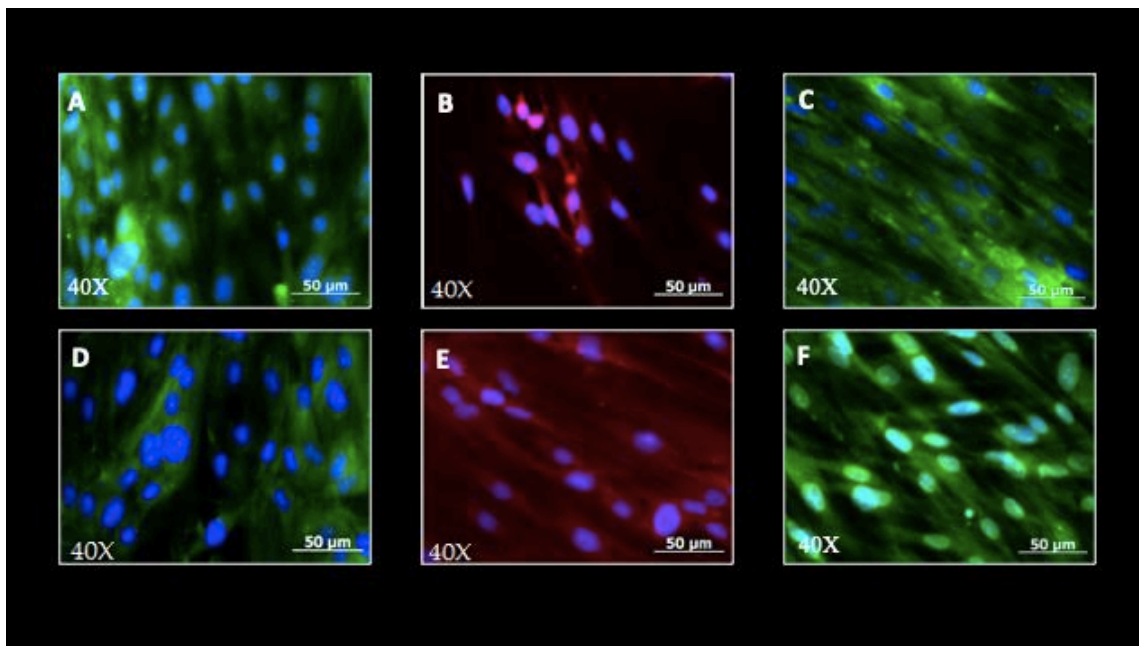


Figura 14. Inmunocitoquímica para identificación de marcadores de membrana presentes en células mesénquimales. A) CD44FITC+, B) CD13PE+, C) CD71FITC+, D) CD90FITC+, E) CD105PE+, F)CD146FITC. Análisis obtenido con Microscopio Invertido de Fluorescencia (Carl Zeiss, Z1)

7.6 Cultivo de Neuroesferas Pre-Inducción

Entre las 48-72 horas, se observó, un aumento en la densidad celular de cada CFU, las células gradualmente cambiaron sus morfologías, reduciendo longitudinalmente y compactando la colonia (CFU) en el Medio Neuronal A (medio de pre-inducción). El tercer día, se observó el acúmulo de células perder adherencia a la superficie de cultivo y formar cuerpos con figura esferoide, estructurados por células mesénquimales. Los cuerpos esferoidales o Neuroesferas, se mantuvieron desarrollando y creciendo en medio de pre-inducción hasta el décimo día. (Figura 15)

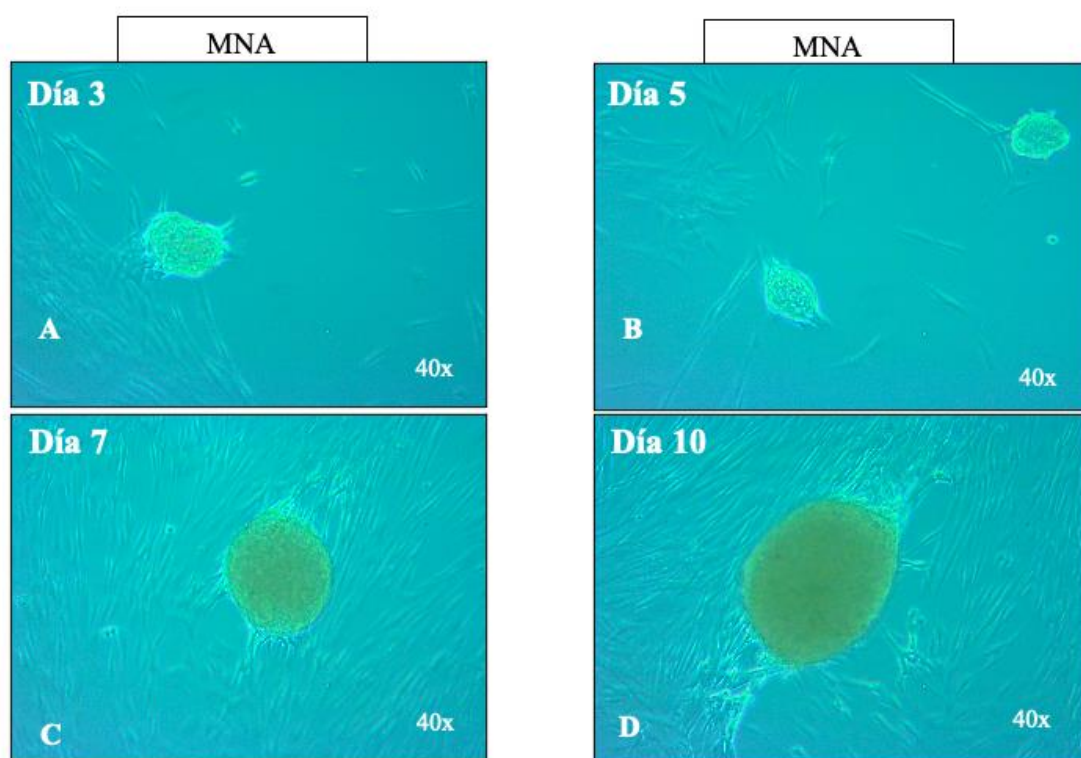


Figura 15. Desarrollo de Neuroesferas en MNA. A) Se observó formación de Neuroesferas a partir del tercer día, apariencia de estructura con centro condensado y un halo perimetral y desarrollo en suspensión (no adherente), B) Al día 5 se observó incremento en el número de Neuroesferas. C) Apartir del septimo día se observó el inicio del incremento en dimensión de las Neuroesferas. D) Células en continua división aumentando las dimensiones de la estructura esferoidal en suspensión.

7.7 Cultivo de Diferenciación Neuronal

Las células derivadas de Neuroesferas, sembradas en superficie tratada con Poly-L-Lysina y en Medio Neuronal B, presentaron modificaciones morfológicas radicales. Comenzando con un tamaño promedio de entre 20-50µm. En cultivo de diferenciación, siendo inducidas con Ácido Retinoico, incrementaron su longitud a más del 50%, emitiendo múltiples prolongaciones, con núcleos condensados, bien definidos y evidentes, cuerpo celular o soma mostrando citoplasma escaso y gránulos en su interior. La densidad celular se redujo considerablemente al inducir a diferenciación neuronal a más del 50%. (Figura 16)

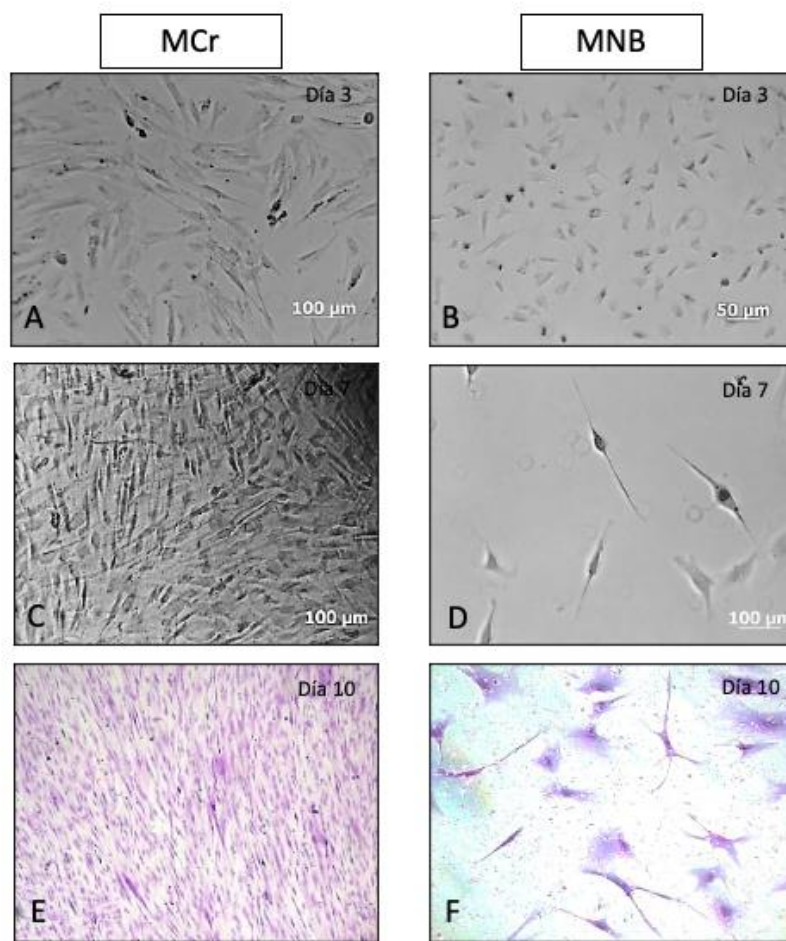


Figura 16. Cultivo de diferenciación Neuronal. A) células mesenquimales en medio de crecimiento al día 3. B) células mesenquimales procedentes de neuroesferas en medio neuronal B al día 3. C) células mesenquimales en proliferación en medio de crecimiento día 7. D) células neuronales en proceso de diferenciación morfológica día 7. E) células mesenquimales en confluencia del 80% al día 10. F) células neuronales diferenciadas al día 10 en MNB.

7.8 Identificación de marcadores Neuronales

Por medio del ensayo con inmunocitoquímica y posterior a inducción con MNB durante 10 días, se evidenció, positividad a los marcadores, Nestina, presente en células del neuroepitelio o precursoras neurales, Tuj-1, marcador positivo de actividad neuronal, relacionada con neurogénesis y crecimiento axonal. Proteína ácida fibrilar glial (GFAP), presente en los filamentos intermedios del citoesqueleto en células de origen neuronal, también señalado como el marcador predominante de neurogénesis constitutiva en el adulto así como también de células gliales. (Figura 17)

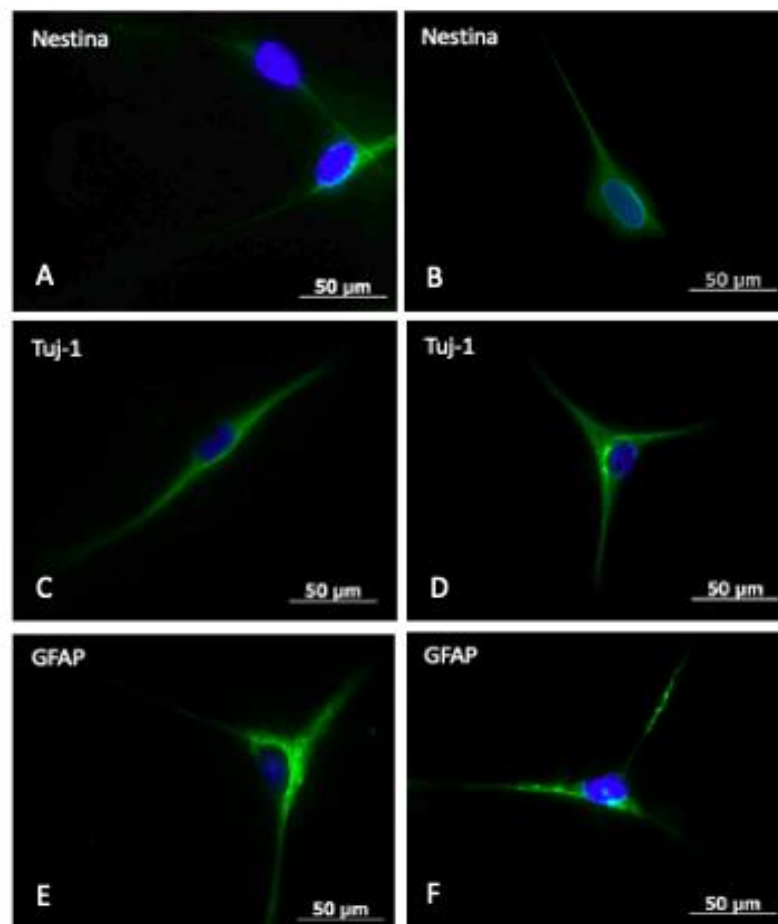


Figura 17. Inmunocitoquímica para identificación de marcadores de membrana presentes en células Neuronales. A y B) células neuronales positivas a marcador Nestina. C y D) células neuronales positivas a marcador Tuj-1. E y F) células neuronales positivas a masrcador GFAP. Análisis obtenido con Microscopio Invertido de Fluorescencia (Carl Zeiss, Z1)

8. DISCUSIÓN

La pulpa dental es un tejido especializado, rico en distintas poblaciones de células, generado a partir de ectomesénquima, tejido formado por ectodermo de células neuroepiteliales y mesodermo (Kawanabe 2012).

En el presente estudio, para la obtención de las muestras, se trabajó con órganos dentarios provenientes de infantes de entre 6 y 9 años de edad, producto de exfoliación natural o dientes indicados como extracción por motivos terapéuticos, así como también, órganos dentarios enucleados, en estos casos premolares de infantes de 9 años en estadio de germen o folículo dentario, que no habían erupcionado aun, siendo el primer estudio reportado donde se realizan ensayos con este tipo de muestra. En otros se han documentado con gérmenes dentarios de terceras molares de pacientes adultos (Takeda *et al.*, 2008).

Esta es la primera ocasión donde se reporta la separación magnética con el anticuerpo SSEA-4 de una población de células mesénquimales provenientes de pulpa dental de dientes deciduos (SHED). En otros estudio se reportó la identificación (mas no la purificación de una población con este anticuerpo) por medio de Citometría de Flujo, a partir de células de pulpa dental de adultos (DPSC) (Kawanabe *et al.*, 2012). Por otra parte, en cuanto a este marcador de células en estadio embrionario, también ha sido identificado como marcador de células en estados de diferenciación neuronal (Brochner y Mollga, 2016).

La obtención de células mesénquimales, por medio de separación magnética con el anticuerpo SSEA-4 (Stage Specific Embryonic Antigen por sus siglas en ingles), es de suma relevancia ya que este antígeno se expresa en etapas de pre-implantación embrional, embriogénesis y subsecuentemente es encontrado en células mesénquimales indiferenciadas (Henderson *et al.*, 2002), por ello podemos deducir que en la pulpa dental de dientes deciduos, existe una población de células que expresan SSEA-4, de la misma manera que lo hacen las células neuroepiteliales y progenitoras neuronales durante el proceso de diferenciación. Estos hallazgos nos permiten comparar la potencialidad de

nuestra población celular, con las células descritas como Navie, que presentan estado de pluripotencialidad (Wang *et al.*, 2018)

De acuerdo con los resultados obtenidos se establece que en la pulpa dental de dientes deciduos, existe una población de células que expresan SSEA-4, de la misma manera que lo hacen las células neuropiteliales y progenitoras neuronales durante el proceso de diferenciación, además queda demostrado que el marcador SSEA-4 es un antígeno específico que puede ser usado para el aislamiento y purificación de células mesenquimales provenientes de pulpa dental de dientes deciduos.

El cultivo de células SHED obtenido por separación magnética, se caracterizó e identificó, como una población bien purificada de células mesenquimales, confirmado así por medio de Inmunocitoquímica y Citometría de Flujo, obteniendo resultados positivos a los anticuerpos correspondientes de células mesénquimales y negatividad a los anticuerpos de células hematopoyéticas. Tal cual lo describe Bianco *et al.*, 2001 para la identificación de células mesénquimales. En cultivo mostraron ser células dependientes de adhesión a superficie, con forma espigada, organizarse en colonias y ser altamente clonogénicas (Gronthos *et al.*, 2000).

Los resultados de ésta investigación, proveen evidencia, que al suplementar el cultivo de células SHED con factores de crecimiento EGF, FGF y una mínima concentración de SFB, conduce a una rápida formación de Neuroesferas a partir del día 3, en comparación con otros estudios donde se ha reportado su formación a los 6 días y el tratamiento fue llevado con DPSC (Gervois *et al.*, 2015).

Concluyendo el tiempo de inducción-diferenciación, en las células SHED y obtener resultados positivos a marcadores, que son identificados en células neuronales, resulta importante señalar, que se decidió trabajar con pulpa dental de dientes deciduos ya que al obtenerse de pacientes infantiles que se encuentran en etapas tempranas de crecimiento y desarrollo humano, las células obtenidas de una muestras con estas características

presentan un potencial de proliferación y diferenciación mayor, que en el caso de muestras obtenidas a partir de pacientes adultos.

El proceso de neurogenesis en el periodo posnatal, requiere de multiples pasos como lo son, proliferación, diferenciación, migración, asentamiento celular e integración sinaptica, durante cada una de estas etapas distintos marcadores o antígenos son expresados, en el caso de Nestina desde 1990 fue reportada su expresión en la mayoría de las células que fungen como precursores neuronales, así también presente en relación al desarrollo morfológico de células neuronales y gliales. En cuanto al marcador Tuji-1, conocido por ser parte de la familia de las beta tubulinas, ha sido reportado su papel en los procesos de mitosis y motilidad en células neuronales, siendo posible su identificación en procesos como neurogénesis, desarrollo y mantenimiento axonal. Menezes y Luskin lo emplearon para el marcaje de células neuronales inmaduras en estado pos-mitosis. La identificación del antígeno o marcador GFAP en conjunto con Nestina es reportado en estados de proliferación de células precursoras neuronales, y por si solo en estadios de diferenciación de células gliales en particular astrocitos (Bohlen and Halbach, 2011).

Con los resultados positivos obtenidos en nuestra investigación, por medio de inmunocitoquímica a los marcadores neuronales Nestina, Tuji-1 y GFAP, puede establecerse que las células de pulpa dental que se encuentran en dientes deciduos, al ser tratadas con medio de inducción neuronal, se comportan como células precursoras neuronales, las que cuentan con la capacidad de maduración a linaje neuronal y glial. Por ello también se puede considerar que presentan un comportamiento pluripotencial al tener la capacidad de originar linajes celulares provenientes de mesodermo y ectodermo.

Comparando las células madre mesenquimales de pulpa dental de dientes deciduos en cuanto a los aspectos éticos y terapéuticos con las células madre obtenidas de tejido embrional humano y las células madre pluripotentes inducidas, las consideraciones éticas para el manejo de esta línea celular no se encuentran en controversia, como para el manejo de células embrionales, ya que la muestra de tejido obtenido de pulpa dental, es considerado un desecho biológico, el cual no atenta contra la vida. Por otra parte, aunque las células pluripotentes inducidas han sido consideradas como superiores a las obtenidas

de tejido embrional, ya que para su formación no se requiere de la destrucción de tejido embrional, se a identificado en su manejo inestabilidad genómica lo cual a generado la formación de células tumorales en ensayos de diferenciación acuñado esto al proceso de reprogramación, por le que esta linea celular, aun no es considerada segura para su aplicación clínica. Por ello se pueden considerar a las células SHEDS como fuente potencial para la inclusión de terapias en medicina regenerativa personalizada. (Takahashi and Yamanaka., 2006) (Volarevic *et al.*, 2018)

Nuestra línea de investigación comenzó en el año 2000 al ser identificadas células madre mesénquimales en la pulpa dental humana (Gronthos *et al.*, 2000), posteriormente fueron identificadas en órganos dentarios de la dentición primaria (Shi *et al.*, 2003). En diversos estudios se ha identificado su capacidad de diferenciación al ser inducidas para la formación de linaje óseo, cartilaginoso, muscular e inclusive la formación de dentina, (Jiang *et al.*, 2006). La capacidad de diferenciación a linaje neuronal, es de los campos más nuevos en la investigación de estas células a nivel mundial (He *et al.*, 2007), en particular en México esta línea de investigación en Odontología a nivel Nacional, es de reciente creación y su relación con las Neurociencias se encuentra en consolidación.

9. CONCLUSIONES

- De un total de 40 muestras de pulpa dental obtenidas, de donantes de entre 6 y 9 años de edad, en promedio se encontraron por muestra 50,000 células viables. Se concluye que las células obtenidas de pulpa dental de dientes deciduos, son una población altamente clonogénica al presentar un tiempo de duplicación de 21.59 hrs y apartir de la densidad inicial alcanzar el 100% de confluencia en frasco de cultivo celular falcon de 25cm² el día 14 posterior a su siembra.
- Los gérmenes dentarios obtenidos a partir de premolares enucleados, de infantes de 9 años de edad, presentaron una mayor cantidad de tejido pulpar y mayor densidad celular al conteo en cámara de Neubauer, en comparación con el tejido pulpar obtenido de dientes exfoliados y extraídos.
- La obtención por medio de separación magnética de células positivas en pulpa dental humana de dientes deciduos, al marcador SSEA-4, nos permite concluir que, la pulpa dental humana de dientes deciduos, es un tejido conectivo especializado, del cual en su interior, se identifican células mesénquimales, que presentan características similares a las células embrionales y precursoras neuronales.
- El marcador SSEA-4 es un antígeno específico que puede ser usado para el aislamiento y purificación de células mesenquimales pluripotentes, provenientes de pulpa dental de dientes deciduos.
- Las células resultantes de la separación magnética, con el anticuerpo SSEA-4, fueron identificadas como células mesenquímales por medio de Citometría de Flujo al presentar negatividad a los marcadores de membrana CD14 y CD45, presentes en células madre hematopoyéticas y ser positivas a los marcadores de membrana CD44, CD105 y CD13, presentes en células madre mesénquimales. Por medio del ensayo de Inmunocitoquímica fue posible identificar positivos a los

marcadores de membrana de células mesénquimales CD44, CD71, CD13, CD105, CD90 y CD146.

- Durante la etapa de pre-inducción, la cual fue llevada con MNA, se indujo a la proliferación y selección de células con un alto grado de potencialidad. A partir de la inclusión de los factores de crecimiento EGF y FGF, al día 3 en MNA, las células SHEDS positivas a el marcador SSEA-4, se organizaron en complejos de neuroesferas. Las neuroesferas se presentaron como una masa celular compactada, circunscrita por un halo y mantenida en suspensión.
- Las células mesenquimales del pulpa dental de dientes deciduos, obtenidas por separación magnética con el anticuerpo SSEA-4, presentan un alto grado de potencialidad, al manifestar su organización en complejos de neuroesferas.
- Se establece que el Ácido Retinoico, es un promotor de diferenciación neuronal de las células presentes en Neuroesferas, al ser trasladadas a MNB.
- La población celular de pulpa dental de dientes deciduos, obtenida con separación magnetica con anticuerpo SSEA-4, presenta un comportamiento pluripotencial, con capacidad similar a la que se encuentra en las células precursoras neuronales, ya que al ser inducidas con medios de diferenciación neuronal, evidencian positividad a los maracadores Nestina, Tuji-1 y GFAP.
- Las células pulpa dental de dientes deciduos, obtenidas con separación magnetica con anticuerpo SSEA-4, posterior a ser inducidas con medios de diferenciación neuronal (MNA y MNB), presentan positividad a los marcadores Nestina, Tuji-1 y GFAP, los cuales son identificados de igual forma en los procesos de neurogénesis y crecimiento axonal, así como tambien, en células de origen neuronal como lo son, las células neuroepiteliales, precursoras neuronales y gliales.

10. PERSPECTIVA

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, identificamos la importancia de que la línea de células mesénquimales de pulpa dental de dientes deciduos, continúe en desarrollo, en particular, para el campo de Ciencias de la Salud que corresponde a trastornos del Sistema Nervioso, que como ya se ha mencionado en este escrito, los tratamientos para los padecimientos de mayor incidencia en el rubro, como, Demencia, Epilepsia, Accidente Cerebro Vascular, Alzheimer, Parkinson, Esclerosis Múltiple, Herpes Zoster y Neuralgia del trigémino, no ofrecen la resolución completa de la enfermedad. El potencial de diferenciación hacia linaje neuronal por parte de las células SHEDS, es una opción prometedora para la inclusión de medicina personalizada, basada en la obtención de células mesénquimales, a partir de tejido pulpar del mismo paciente.

Dentro del área de la odontología su aplicación en neuropatías, como parestesias y neuralgia del trigémino, sería de suma utilidad, ya que estos padecimientos, tienen una evolución crónica y progresiva.

Para su aplicación en el campo clínico, aun hay mucho trabajo de investigación por hacer. Como evolución del proyecto, es importante continuar explorando la capacidad de diferenciación de las células SHEDS, hacia otros linajes neuronales, así como también, la identificación *in vitro* de la funcionalidad sináptica entre las células ya diferenciadas.

Establecido en las células diferenciadas, el potencial de funcionalidad sináptica, sería relevante para una futura aplicación clínica, su aplicación en modelo animal con parestesia inducida, para la identificación de su capacidad en la reparación y renovación de tejido neuronal *in vivo*.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Dugger B, Dickson D. 2017. Pathology of Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. doi: 10.1101/cshperspect.a028035.
2. Ciaramitaro P, Mondelli M, Logullo F, Grimaldi S, Battiston B, Sard A, Scarinza C, Migliaretti G, Faccani G, Cocito D. 2010. Traumatic peripheral nerve injuries: epidemiological findings, neuropathic pain and quality of life in 158 patients. *Journal of the Pheripheral Nervous System*. 15:120-127.
3. Miura M, S Gronthos, M Zhao, B Lu, LW Fisher, PG Robey, S Shi . 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5807 – 5812.
4. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. 2002. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sc*. vol. 97 no. 25 :13625–13630, doi: 10.1073/pnas.240309797
5. Maximow A. 1909. Der lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschieden Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und postfetalen Leben der Saügetiere. *Folia Haematologica (Leipzig)*;8: 125–141.
6. Danckhoff V. 1916. Origin of blood cells. Development of the haematopoietic organs and regeneration of the blood cells from the standpoint of the monophyletic school. *Anatomical Record*; 10:397–414.
7. Kracke RR. 1941. Diseases of the Blood and Atlas of Hematology, 2nd edn, J.B. Lippincott Company: Philadelphia.
8. Sabin F.R., M.D., Miller. M.D., Smithburn, K.C. M.D., Thomas, R.M., M.D., Hummel E.L. M.D. 1936. Changes In The Bone Marrow And Blood Cells Of Developing Rabbits. From the Laboratories of The Rockefeller Institute for Medical Research).
9. Goodman W, Hodgson J. 1962. Evidence for Stem Cells in the Peripheral Blood of Mice. *Blood Journal Hematology*. 19: 702-714.
10. Lewis J, Trobaugh F, 1964. Haematopoietic Stem Cells. *Nature*. 7;204: 589-90., doi:10.1038/20459a0.

11. Trentin J, Wolf N, Cheng V, Fahlberg W, Weiss D, Ronhag R Trentin J, Wolf N, Cheng V, Fahlberg W, Weiss D, Ronhag R: 1967. Antibody production by mice repopulated with limited numbers of clones of lymphoid cell precursors. *J Immunol* 98:1326-1337.
12. Bach FH, Joo P, Albertini RJ, Anderson JL, Borton MM. 1968. Bone marrow transplantation in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 2:1364-1366.
13. Bortin, M. 1970. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* 9:571-587.
14. Bach FH. 1970. Transplantation: pairing of donor and recipient. *Science* 168:1170-1179.
15. Santos GW, Sensenbrenner LL, Burke PJ, Colvin OM, Owens AH jr, Bias WB, Slavin RE. 1971. Marrow transplantation in man following cyclophosphamide. *Transpl Proc* 3:400-40
16. Nakahata, T., and M. Ogawa. 1982. Identification in culture of a class of hemopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:3843-3847.
17. Dexter TM. 1987. Stem cells in normal growth and disease. *British Medical Journal* Volume 295.
18. Owen M. E., Cavé J., Joyner C. J.. 1987. Clonal Analysis In Vitro Of Osteogenic Differentiation Of Marrow CfU-F. *Mrc Bone Research Laboratory, Nuffield Department Of Orthopaedic Surgery. Journal of Cell Science* 87, 731-738.
19. Owen M., Friedenstein AJ. 1988. Stromal Stem Cells: Marrow-derived osteogenic Precursors. *University of Oxford.* 136:42-60.
20. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AM. 1992. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone.* 13(1):69-80.
21. Pittenger MF et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 2,284(5411):143-7.
22. Colter DC, Class R., DiGirolamo CM., Prockop DJ. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Vol 97, No. 7.* 3213-3218.

23. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey P. 2001. Bone marrow stem cells: nature, biology and potential applications. *Stem Cells*. 19 (3):180-92, doi:10.1634/stecells.19-3-180.
24. Rojas M, Meruane M. 2021. Potencialidad celular evolutiva y medicina regenerativa. *Int. J. Morphol.* Vol30, n.4, pp.1243-1252. ISSN 0717-9502, doi.org/10.4067/S0717-95022012000400001.
25. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC. 2002. Pluripotency of Mesenchymal stem cell derived from adult marrow. *Nature*. 418:41-49.
26. Herzog EL, Chail L, Krause DS. 2003. Plasticity of marrow derived stem cells. *Blood*. 102:3483-3492.
27. Rutenberg MS, Hamazaki T, Singh AM, Terada N. 2004. Stem cell plasticity beyond alchemy. *Int J. Hematol.* 79:15-21.
28. Heike T, Nakanata T. 2004. Stem cell plasticity in the hematopoietic system. *Int J Hematol.* 79:7-14.
29. Gronthos S, Li J, Fisher L, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey P, Shi S. 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 81(8):531-5, doi:10.1177/1544059102081008006.
30. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Rowitch DH, Soriano P. 2000. Fate of the mammalian cranial crest during tooth and mandibular morphogenesis development. 127:1671-1679.
31. Chang J., Zhang C., Tani-Ishii N., Shi S., Wang CY. 2005. NF- κ B activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *Journal of Dental Research*. Volume 84 • Number 11. 994-998.
32. Iohara K, Zheng L. 2006. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *STEMCELLS*; 24:2493–2503.
33. Robey PG, Bianco P. 2006. The use of adult stem cell in rebuilding the human face. *J Am Dent Assoc*. 137 (7) 961-72.

34. Morzseck C. et al. 2010. Comparison of human dental follicle cells and stem cells from human exfoliated deciduous teeth after neural differentiation in vitro. Clin Oral Investig. 14(4) 433-40.
35. Wang J, Wang X, Sun Z, Wang X, Yang H, Shi S, Wang S. 2010. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. STEM CELLS AND DEVELOPMENT. Volume 19, Number 9, 1375-1383
36. Nourbakhsh N. et al. 2011. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. Int. J. Dev. Biol. 55: 189-195
37. Sakai K., Yamamoto A., Matsubara K., Nakamura S., Naruse M., Yamagata M., Sakamoto K. 2012. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. The Journal of Clinical Investigation Volume 122 Number 1. 80-90.
38. He Z, Jin Y, 2016. Intrinsic control of axonal regeneration. Neuron. 4;90(3):437-51, doi10.1016/j.neuron.2016.04.022.
39. Kawanabe N, Fukushima H, Ishihara Y, Yanagita T, Kurosaka H, Yamashiro T. 2014. Clin Oral Invest. Doi 10.1007/s0078-014-1260-z.
40. Takeda T, Horiuchi M, Hosono K, Hatakeyama K, Miyaki S, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K. 2008. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. Journal of Dental Research. Doi:10.1177/154405440591108008700716.
41. Brochner C, Mollga K. SSEA-4 and YKL-40 Positive progenitor subtypes in ventricular zone of developing human neocortex. Glia. 2016. 64;904.
42. Henderson J, Draper J, S, S, Thomson J, Moore H, Andrews P. 2009. Stem Cells. Preimplantation Human Embryos and Embryonic Stem Cells Show Comparable Expression of Stage-Specific Embryonic Antigens. <https://doi.org/10.1634/stemcells.20-4-329>.
43. Wang Y, Zhao C, Hou Z, Yang Y, Bi Y, Wang H, Zhang Y, Gao S. Unique molecular events during reprogramming of human somatic cells to induced pluripotent stem cells (iPSCs) at naive state. eLife 2018; 7:29518.
44. Gervois P, Struys T, Hilken P, Bronckaers A, Ratajczak J, Lambrechts C, Marten W. 2015. Neurogenic Maturation of Human Dental Pulp Stem Cells Following Neurosphere Generation Induces Morphological and Electrophysiological

Characteristics of Functional Neurons. STEM CELLS AND DEVELOPMENT. Volume 24, Number 3, 2015. DOI: 10.1089/scd.2014.0117.

45. Bohlen O, Halbach · 2011. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Tissue Res.* 345(1):1-19. doi: 10.1007/s00441-011-1196-4.
46. Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126:663-676.
47. Volarevic V, Markovic B, Gazdic M, Volarevic A, Jovicic N, Arsenijevic N, Armstrong L, Djonov V, Lako M, Stojkovic M. 2018. Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *International Journal of Medical Sciences.* 15(1): 36-45.
48. Shi S, Gronthos S. 2003. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp *J Bone Miner Res.* 18(4):696-704. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.4.696.
49. Jiang W, Ma A, Wang T, Han K, Liu Y, Zhang Y, Dong A, Du Y, Huang X, Wang J, Lei X, Zheng X. 2006. Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium in vivo: a time-series study. *Lugers Arch, Epub* 453(1):43-52. doi: 10.1007/s00424-006-0117-y.
50. He H, Jin Y, Shi J, Luo Y, Zhou Y, Peng Z, Xu Y. 2007. Experiment on inducing human dental pulp stem cells into neural-like cells. *PMID:17896484.* 25(4):331-4